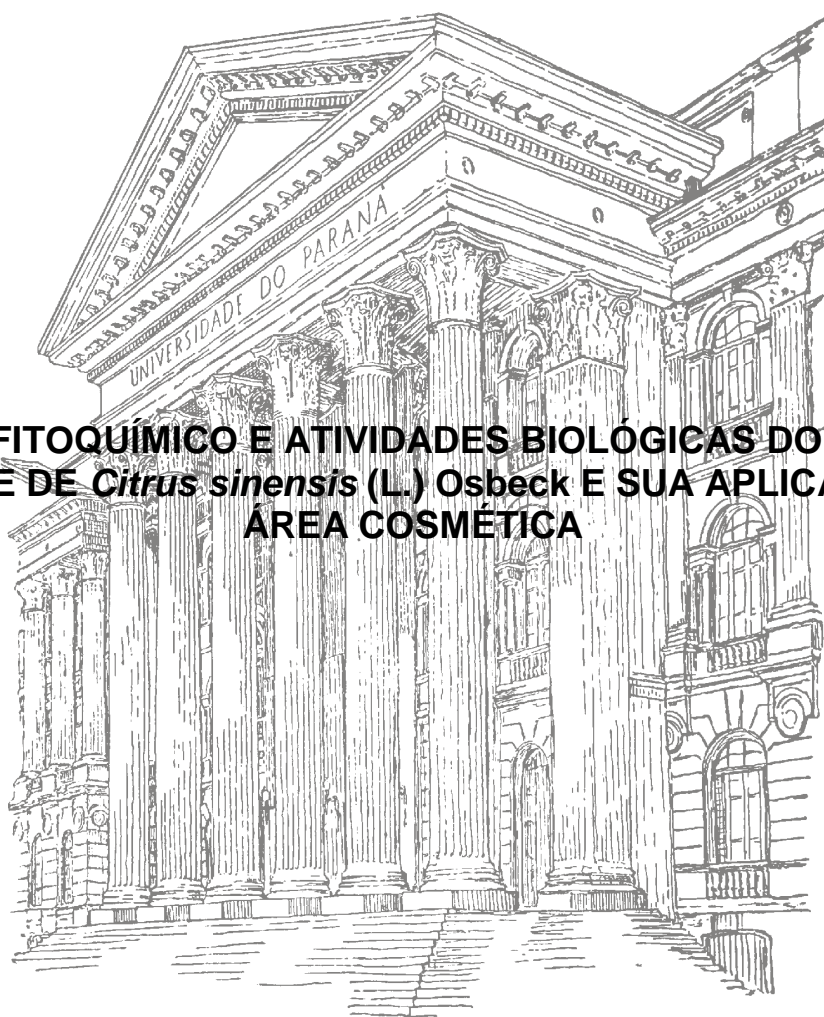


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA MAYRA PAVAN NUNES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO DA  
SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck E SUA APLICAÇÃO NA  
ÁREA COSMÉTICA**



CURITIBA  
2011

PATRÍCIA MAYRA PAVAN NUNES

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO DA  
SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck E SUA APLICAÇÃO NA  
ÁREA COSMÉTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> *Marilis Dallarmi Miguel*  
Co-Orientadores: *Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Maria Warumby Zanin*

CURITIBA  
2011

Nunes, Patrícia Mayra Pavan

Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de  
*Citrus sinensis* (L.) Osbeck e sua aplicação na área cosmética /  
Patrícia Mayra Pavan Nunes – Curitiba: UFPR, 2011.

175 f.: il.; 30 cm

Orientadores: Marilis Dallarmi Miguel,

Corientadores: Obdúlio Gomes Miguel e Sandra Maria Warumby  
Zanin

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal  
do Paraná

Referências bibliográficas: f. 160-173

1. semente 2. *Citrus sinensis* (L.) Osbeck . 3. Rutaceae. 4.  
Antioxidante. 5. Tirosinase. 6. Alelopatia. 7. Dermocosméticos. 8.  
Toxicidade. I. Miguel, Marilis Dallarmi. II. Miguel, Obdúlio Gomes. III.  
Zanin, Sandra Maria Warumby. IV. Universidade Federal do Paraná.  
V. Título.

CDD 615.32

*“O tempo não volta atrás, portanto, plante seu jardim e decore sua alma, ao invés de esperar que alguém lhe mande flores”*

*(William Shakespeare)*

## **AGRADECIMENTOS**

À **Deus**, pela proteção, força e paz interior, que me encorajaram nos momentos em que tudo parecia impossível e infindáveis. Sempre atendeu as minhas preces e permitiu que concluísse mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, **Vera** e **João** e o restante da minha família que com muito amor sempre me apoiaram, sem medir forças para que realizasse meus sonhos. Obrigada pelo incentivo, apoio incondicional e por permitir que tudo isso fosse possível.

Ao meu marido **Marcos**, pelo companheirismo, paciência, amor, e por ter sido meu grande incentivador na busca desse sonho. Me apoiou incondicionalmente cada uma das minhas decisões, principalmente nos momentos de desânimo. Sem ele essa jornada certamente teria sido muito mais difícil.

A minha querida amiga e orientadora **Profª Dra. Marilis Dallarmi Miguel** por sempre estar à busca de um bem comum, por ter me recebido e aberto à porta de seu laboratório com tanto carinho e amizade. Tenho grande admiração pela mulher guerreira, determinada que ela é.

Aos Co-orientadores **Profº Dr. Obdúlio Gomes Miguel** e **Profª Drª Sandra Maria Warumby Zanin** pela confiança, carinho, paciência, amizade, oportunidades e conhecimento.

Aos meus amigos doutorandos: **Cristiane Peitz**, **Cristiane Mayumi**, **Milena Kalegari**, e **Josiane de Fátima G. Dias**, por tudo o que vocês me ensinaram dando a oportunidade de acompanhar em parte do desenvolvimento de seus trabalhos e pela amizade.

**Cristiane Bezerra** pela amizade, carinho e apoio e pelos experimentos de alelopatia e estatístico que muito contribuíram para o trabalho.

**Maria Cristina Verdam** que em pouco tempo tornou-se uma grande amiga agradeço por ter estado presente na reta final desse trabalho me apoiando e me escutando.

**Walmes Marques Zeviani** pela ajuda na análise estatística alelopática.

Aos meus amigos mestrandos: **Fernanda Smolarek, Camila, Beatriz, Fernanda Colombi, Patrícia Mazureki** pela amizade sincera, apoio, por terem dividido comigo suas experiências, pelas boas risadas nos momentos de desânimo, nos cafezinhos, pelas discussões informais sobre nosso trabalho que muito contribuíram para meu crescimento científico.

Aos alunos de iniciação científica: **Margani, Gabriel, Daniela, Suelen e Fernando** meu muito obrigada pela ajuda e amizade.

**Pedro** não tenho palavras para agradecer o ensinamento fornecido com tanta humildade, carinho e paciência.

A amiga **Gracinha** pela disponibilidade em auxiliar com as medidas de Espectrofotometria.

Em fim, **a todos vocês meus amigos**, agradeço do fundo do meu coração por tudo, principalmente pela amizade que carregarei comigo sempre!

À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

Ao produtor **César** por disponibilizar as laranjas.

A **Profª Maria Rita Sierakowski** por disponibilizar seu laboratório para a realização do estudo do comportamento reológico do óleo.

À **Profª Drª Ana Luisa Lavaca Lordello**, do Departamento de Química da UFPR, pela ajuda na obtenção interpretação dos espectros, e principalmente pelo carinho e amizade.

Aos **membros das bancas de qualificação** de mestrado pela valiosa contribuição e colaboração para que esse trabalho de pesquisa fosse realizado com êxito.

Aos professores e amigos da **Universidade Metodista de Piracicaba - UNIMEP**, que contribuíram para a minha formação. Pela amizade neste momento importante na vida, a graduação.

Aos docentes do **Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPR**, pelo conhecimento científico adquirido e a todos os **funcionários da UFPR** que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao botânico **Gert Hatschbach**, pela identificação da espécie em estudo.

Ao **Carlos** representante da Clariant® e Dow Corning® que gentilmente forneceu matérias-primas para o desenvolvimento deste trabalho.

A empresa **All Nature** por disponibilizar os laboratórios para realização das estabilidades. Em especial ao **Carlos** proprietário e a **Carolina** farmacêutica que muito me auxiliou.

Ao departamento de **Bioquímica da Universidade Federal do Paraná** e a empresa **Imcopa** pelos CG-EM e CG.

À **Angela**, microbiologista do Hospital de clínicas pelas análises microbiológicas.

À equipe do professor **Michel**, em especial minha grande amiga **Patrícia Mazureki**, pelas análises da tirosinase.

A **CAPES** pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, fizeram parte desta fase da minha vida e contribuíram para a concretização deste trabalho, cujos nomes não Figuram neste texto, mas estão presentes na memória e principalmente no coração!

Meus sinceros agradecimentos!

## SUMÁRIO

	<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>12</b>
	<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>15</b>
	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>16</b>
	<b>LISTA DE QUADROS .....</b>	<b>18</b>
	<b>LISTA DE SIGLAS .....</b>	<b>19</b>
	<b>LISTA DE SÍMBOLOS .....</b>	<b>21</b>
	<b>RESUMO .....</b>	<b>23</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>24</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO .....</b>	<b>27</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	27
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>29</b>
3.1	ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck (LARANJA DOCE).....	29
3.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA RUTACEAE .....	29
3.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Citrus</i> .....	30
3.3.1	Origem de <i>Citrus</i> .....	32
3.3.2	Aspectos econômicos.....	33
3.3.3	Importância sanitária e atividades biológicas do <i>Citrus</i> .....	34
3.3.3.1	Considerações sobre a composição química do Óleo de <i>Citrus</i> .....	36
3.3.3.2	Limonóides e suas atividades biológicas.....	36
3.4	ÓLEOS VEGETAIS E APLICAÇÃO COSMÉTICA .....	37
3.5	PELE .....	38
3.5.1	Constituição da pele .....	40



3.6	EMULSÕES.....	41
3.6.1	Estabilidade das emulsões .....	42
3.7	MICROENCAPSULAÇÃO .....	43
4	<b>METODOLOGIA</b> .....	45
4.1	PRIMEIRA FASE: DA COLHEITA DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck À AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES .....	47
4.1.1	Método de obtenção das sementes.....	47
4.1.2	Determinação da umidade.....	49
4.1.3	Determinação das cinzas totais.....	49
4.1.4	Obtenção das frações.....	49
4.1.5	Isolamento e caracterização dos compostos.....	51
4.1.5.1	Identificação do óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	52
4.1.5.1.1	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)	52
4.1.5.1.2	Cromatografia gasosa .....	53
4.1.6	Análises físico-químicas do óleo (Fração Hexânica) .....	53
4.1.6.1	Parâmetro reológico de viscosidade.....	53
4.1.6.2	Densidade .....	54
4.1.6.3	Espalhabilidade .....	54
4.1.7	Métodos de avaliações biológicas das frações de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	55
4.1.7.1	Avaliação da atividade antimicrobiana das frações <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	55
4.1.7.2	Avaliação da atividade antioxidante.....	56
4.1.7.2.1	Formação do complexo fosfomolibdênico .....	56
4.1.7.2.2	Redução de radical DPPH.....	57
4.1.7.3	Ensaio <i>in vitro</i> da atividade de enzima Tirosinase.....	59
4.1.7.4	Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> .....	60
4.1.7.4.1	Preparação da solução salina .....	60

4.1.7.4.2	Preparo das amostras .....	60
4.1.7.4.3	Eclosão dos ovos .....	61
4.1.7.4.4	Avaliação da toxicidade .....	62
4.1.7.5	Atividade hemolítica.....	62
4.1.7.6	Bioensaios da atividade alelopática.....	63
4.1.7.6.1	Bioensaios de germinação e crescimento .....	63
4.1.7.6.2	Análise do índice mitótico.....	64
4.1.7.6.3	Análise enzimática.....	65
4.1.7.6.3.1	Preparo do material vegetal para testes de atividade enzimática .....	65
4.1.7.6.4	Análise estatística.....	68
4.2	SEGUNDA FASE: APLICAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DA SEMENTE DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck EM EMULSÕES AO MICROENCAPSULAMENTO DO ÓLEO DE SEMENTE DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	68
4.2.1	Desenvolvimento da formação cosmética .....	68
4.2.1.1	Matérias-primas para preparação das emulsões.....	69
4.2.1.2	Formulações desenvolvidas com Óleo da Semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	72
4.2.1.3	Obtenção das emulsões .....	72
4.2.1.3.1	Emulsão preparada em processo a quente.....	72
4.2.1.3.2	Emulsão preparada em processo a frio.....	73
4.2.2	Caracterização da formulação desenvolvida .....	73
4.2.2.1	Análise macroscópica e organoléptica .....	73
4.2.2.2	Avaliação de homogeneidade por microscopia .....	74
4.2.2.3	Determinação do tipo de emulsão .....	74
4.2.2.4	Teste de espalhabilidade <i>in vitro</i> das emulsões formuladas com óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	75
4.2.2.5	Medida do pH das emulsões .....	75
4.2.2.6	Determinação da densidade.....	76

4.2.2.7	Determinação da viscosidade da emulsão formulada .....	76
4.2.3	Testes preliminares de estabilidade das emulsões .....	76
4.2.3.1	Testes de centrifugação .....	77
4.2.3.2	Estresse térmico .....	77
4.2.4	Teste de estabilidade acelerada das emulsões .....	77
4.2.4.1	Ciclo gela degela .....	78
4.2.5	Avaliação sensorial das emulsões formuladas com óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	79
4.2.6	Ensaio de irritação em modelo organotípico HET-CAM utilizando a formulação escolhida.....	80
4.2.6.1	Ensaio de irritação em modelo organotípico HET-CAM .....	81
4.2.6.2	Preparação da membrana coriolantóide .....	81
4.2.6.3	Aplicação da amostra .....	82
4.2.6.4	Controles positivos .....	82
4.2.6.5	Observação da membrana .....	83
4.2.6.6	Avaliação das lesões .....	83
4.2.7	Obtenção das microcápsulas .....	84
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	86
5.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO.....	86
5.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE .....	86
5.3	DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS.....	86
5.4	OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES: CLOROFÓRMIO, METANOL, HEXANO E ACETATO DE ETILA .....	87
5.5	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS .....	89
5.5.1	Identificação estrutural da substância FC4.....	91
5.6	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	99
5.6.1	Cromatografia gasosa aplicada a espectrometria de massa (CG-EM) .....	100
5.6.2	Cromatografia gasosa (CG).....	104

5.6.2.1	Identificação da subfração FC2.....	107
5.6.3	Comparação da composição centesimal graxa insaturada e saturada do óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck e FC2 com outros óleos vegetais.....	109
5.7	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO .....	110
5.7.1	Parâmetro reológico de viscosidade e fluidez .....	110
5.7.2	Densidade .....	112
5.7.3	Espalhabilidade .....	112
5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	113
5.9	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE .....	113
5.9.1	Formulação do complexo fosfomolibdênico.....	114
5.9.2	Redução do radical DPPH.....	116
5.10	ENSAIO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE.....	119
5.11	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> .....	121
5.12	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRELIMINAR DAS SEMENTES DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck ATRAVÉS DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA....	122
5.13	BIOENSAIOS DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	123
5.13.1	Teste de germinação e crescimento.....	124
5.13.2	Análise do índice mitótico .....	130
5.13.3	Análise da atividade da peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase, Superóxido dismutase, Polifenoloxidase, $\alpha$ -amilase e proteínas totais ..	131
5.13.4	Análise do teor de clorofila e respiração.....	134
5.14	OBTENÇÃO DAS EMULSÕES FORMULADAS COM ÓLEO DA SEMENTE DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	136
5.14.1	Caracterização da formulação desenvolvida .....	138
5.14.1.1	Análise macroscópica e organoléptica .....	138
5.14.1.2	Avaliação de homogeneidade das emulsões por microscopia óptica ....	138
5.14.1.3	Determinação do tipo de emulsão .....	139
5.14.1.4	Teste de espalhabilidade <i>in vitro</i> das emulsões formuladas com óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	139

5.14.2	Estabilidade .....	140
5.14.2.1	Testes preliminares de estabilidade .....	141
5.14.2.2	Estudo de estabilidade acelerada das emulsões .....	143
5.14.3	Avaliação sensorial das emulsões .....	150
5.14.3.1	Interpretação estatística do instrumento de avaliação do teste sensorial .....	150
5.14.4	Ensaio de irritação em modelo organotípico HET-CAM .....	153
5.15	MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	154
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	156
7	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	159
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	160
	<b>ANEXOS</b> .....	174

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Flor de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .	30
Figura 2	– <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	31
Figura 3	– Sementes de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	32
Figura 4	– Estrutura da pele	40
Figura 5	– Fluxograma da metodologia aplicada na primeira fase da pesquisa	46
Figura 6	– Fluxograma da metodologia aplicada na segunda fase da pesquisa	47
Figura 7	– Local de coleta de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .	48
Figura 8	– Árvores da coleta de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	48
Figura 9	– Extrator de Soxhlet.	50
Figura 10	– Coluna cromatográfica	51
Figura 11	– Diluições das amostras com <i>Artemia salina</i>	61
Figura 12	– Etapas do Teste HET-CAM.	82
Figura 13	– Extração das frações.	88
Figura 14	– CCD – comparação da FH e FC2	90
Figura 15	– Espectro de absorção infravermelho da substância FC4	91
Figura 16	– Espectro de RMN <sup>1</sup> H (DMSO, 400MHz) da substância FC4	94
Figura 17	– Espectro de RMN <sup>13</sup> C (DMSO, 100MHz) da mistura FC4	95
Figura 18	– Espectro de RMN <sup>13</sup> C de DEPT 135° (DMSO, 100MHz) da mistura FC4	95
Figura 19	– Estrutura do limonina	97
Figura 20	– Estrutura do limonóide nomilina	99
Figura 21	– Cromatograma I do óleo da semente <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .	101

Figura 22 – Espectro de massas do Éster Metílico do Ácido Palmítico ( $C_{17}H_{34}O_2$ / PM = 270) .....	102
Figura 23 - Espectro de massas do Éster Metílico do Ácido Esteárico ( $C_{19}H_{38}O_2$ / PM = 298) .....	103
Figura 24 – Espectro de massas do Éster Metílico do Ácido Oléico ( $C_{19}H_{36}O_2$ / PM = 296) .....	103
Figura 25 – Espectro de massas do Éster Metílico do Ácido Linoleico ( $C_{19}H_{34}O_2$ / PM = 294) .....	103
Figura 26 – Cromatograma II (CG) do óleo da semente <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	102
Figura 27 – Cromatograma do óleo da fração Clorofórmio (subfração FC2) .....	108
Figura 28 – Análise de espalhabilidade da fração Hexano (FH) .....	112
Figura 29 – Visualização da reação de complexação do Fosfomolibdênio – fração Metanol .....	116
Figura 30 – Análise DPPH da fração Acetato de Etila (FAC) .....	117
Figura 31 – Análise DPPH da fração Metanol (FM) .....	118
Figura 32 – Resultados das frações FC(a), FAC(b), FH(c) e FM(d) frente a enzima Tirosinase .....	121
Figura 33 – Resultados atividade hemolítica [A] resultado negativo, frações [B] controle positivo, Saponina .....	123
Figura 34 – Plântulas submetidas as (A) Fração Hexânica (FH), (B) Fração Clorofórmica (FCL) e (C) Fração Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck, indicando alterações no comprimento de plântulas (hipocórito e radícula) .....	126
Figura 35 - Crescimento médio da raiz e hipocórito e massa seca de plântulas de alface submetidas a fração Hexânica (FH) Fração Clorofórmica (FCL) e Fração Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck ...	127
Figura 36 - Alterações nos padrões morfológicos da região meristemática (zona pilífera e coifa) de plântulas de <i>Lactuca sativa</i> , submetidas as (A) controle com água destilada, fração Hexânica (B,C,D), fração Clorofórmica (E,F,G) e fração Metanólica (H,I,J) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	129
Figura 37 – Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plântulas de alface, expostas a diferentes concentrações das frações	

Hexânica (FH), Clorofórmica (FCL) e Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	131
Figura 38 – Atividade a peroxidase e catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, polifenoloxidase e $\alpha$ – amilase, em plântulas de alface submetidas a fração Hexânica (FH), fração Clorofórmica (FCL) e fração Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	133
Figura 39 – Teor de proteínas totais, em plântulas de alface submetidas à fração Hexânica (FH), fração Clorofórmica (FCL) e fração Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	134
Figura 40 – Teor de clorofila e respiração em raízes de plântulas de alface submetidas à fração Hexânica (FH), fração Clorofórmica (FCL) e fração Metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	135
Figura 41 – Visualização das emulsões formuladas com óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck em microscópio óptico com aumento de 40X com adição de corante para melhor visualização .....	138
Figura 42 – Teste para determinação do tipo de emulsão das três formulações estudadas .....	139
Figura 43 – Teste de espalhabilidade das formulações. ....	140
Figura 44 – Visualização das emulsões após análise estresse térmico .....	143
Figura 45 - Análise microscópica ciclo gela degela .....	145
Figura 46 – Gráficos da viscosidade inicial das formulações (F1, F2, F3) acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	146
Figura 47 – Gráficos do pH inicial das formulações (F1, F2, F3) acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	148
Figura 48 – Gráficos da densidade inicial das formulações (F1, F2, F3) acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	149
Figura 49 - Microcápsulas de alginato de sódio contendo óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	155



## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Reologia da fração Hexano (FH).....	111
Gráfico 2 – Porcentagem de inibição do complexo do Fosofomolibdênio em relação à vitamina C.....	115
Gráfico 3 – Curva da fração Acetato de Etila, pela redução do DPPH .....	117
Gráfico 4 – Curva da fração Metanol pela redução de DPPH .....	118
Gráfico 5 – Avaliação sensorial das formulações F1, F2, F3.....	153

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo .....	84
Tabela 2 – Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos .....	84
Tabela 3 – Resultado cinzas totais das sementes .....	86
Tabela 4 – Rendimento das frações das sementes de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	87
Tabela 5 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN <sup>13</sup> C e do DEPT 135° para FC4 e dados da literatura para limonina (FC4A) .....	96
Tabela 6 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN <sup>13</sup> C e do DEPT 135° para FC4 e dados da literatura para nomilina .....	98
Tabela 7 – Ácidos graxos identificados com seus respectivos teores (%) do óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	101
Tabela 8 – Íons moleculares e ácidos graxos derivatizados correspondentes .	102
Tabela 9 – Ácidos graxos identificados com maiores teores (%) da amostra do óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck analisada por meio da área de pico.....	104
Tabela 10 – Ácidos graxos encontrados com maiores teores (%) do componente FC2 analisada através da área de pico .....	108
Tabela 11 - Comparação entre fração hexânica e FC2 da fração clorofórmica .	109
Tabela 12 - Relação da composição graxa insaturada em relação a alguns óleos utilizados na área cosmética .....	110
Tabela 13 – Resultado da atividade antioxidante pela redução do complexo do fosfomolibdênio .....	115
Tabela 14 – Resultado de IC <sub>50</sub> e Teste de Tukey para redução do DPPH.....	118
Tabela 15 – Mortalidade de <i>Artemia salina</i> e estimativa de CL <sub>50</sub> .....	122

Tabela 16 – Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (G%) de alface submetida a diferentes concentrações da fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL), fração metanólica (FM) de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	125
Tabela 17 – Valores de pH das formulações estudadas, acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	142
Tabela 18 – Resultado do ciclo gela degela .....	145
Tabela 19 – Resultados da viscosidade aparente mínima (cP) inicial das formulações (F1,F2,F3) acrescidas de 2,0% do óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	146
Tabela 20 – Resultado do pH inicial das formulações (F1, F2, F3) acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	147
Tabela 21 – Resultado da densidade inicial das formulações (F1, F2, F3) acrescidas de 2,0% de óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	149
Tabela 22 – Teste não paramétrico de Friedman para comparar as três amostras .....	151
Tabela 23 – Teste U de Mann - Whitney.....	152
Tabela 24 – Classificação, pontuação da formulação nº 3 após o teste de irritação em modelo organotípico- HET-CAM (n=3) .....	154

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Matérias primas utilizadas nas formulações cosméticas.....	70
Quadro 2 – Dados físico-químicos do Hostacerin SAF <sup>®</sup> .....	70
Quadro 3 – Especificações da matéria prima RM 2051 <sup>®</sup> proveniente do informe técnico fornecido pela Dow Corning.....	71
Quadro 4 – Formulações das microcápsulas com óleo de semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck .....	85
Quadro 5 – Formulações com óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	137

## LISTA DE SIGLAS

A/O	–	Água em Óleo
AA	–	Atividade Antioxidante
Abs	–	Absorbância
APX	–	Superóxido dismutase
ATCC	–	American Type Culture Collection
BHT	–	Butil Hidroxi Tolueno
C	–	Carbono
CAT	–	Catalase
CCD	–	Cromatografia de Camada Delgada
CG	–	Cromatografia Gasosa
CG–EM		Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CIM	–	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	–	Clinical and Laboratory Standards Institute
CL <sub>50</sub>	–	Concentração letal média
d	–	Dubleto
D <sup>2</sup>	–	Diâmetro ao quadrado
dd	–	duplo dubleto
DEPT-		Distortioless Enhancement by Polarization Transfer (Melhoramento sem distorção por transferência de polarização)
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	–	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	–	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EDTA-Na		Etilenoaminotetracetato Tetrasódico
Ei	–	Espalhabilidade máxima
<i>et al.</i>	–	E Colaboradores
FAC	–	Fração Acetato de Etila
FC ou FCL		Fração Clorofórmio
FH	–	Fração Hexânica
FM	–	Fração Metanol
IV	–	Infravermelho
IVG	–	Índice de Velocidade de Germinação

mDO	–	Mili Densidade Óptica
MHz	–	Megahertz
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		Sulfato de sódio
NaCl	–	Cloreto de Sódio
NaOH	–	Hidróxido de Sódio
nm	–	Nanômetro
O/A	–	Óleo em Água
pH	–	Potencial hidrogeniônico
PM	–	Peso Molecular
POD	–	Peroxidase
POL	–	Polifenol oxidase
ppm	–	Parte por milhão
PR	–	Paraná
RMN- <sup>13</sup> C		Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN- <sup>1</sup> H		Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPM	–	Rotações por Minuto
s	–	Singleto
SOD	–	Superóxido dismutase
TTC	–	Cloridrato de Trifenil Tetrazólio
UEA	-	Unidade de atividade enzimática
UFC	–	Unidades Formadoras de Colônia
UI	–	Unidade Internacional
UV	–	Ultravioleta
W	–	Watts
10x	–	Ampliação total da imagem de 100 vezes. Lentes oculares que aumentam dez vezes a imagem e lente objetiva que amplia dez vezes a imagem.
40x	–	Ampliação total da imagem de 400 vezes. Lentes oculares que aumentam dez vezes a imagem e lente objetiva que amplia quarenta vezes a imagem.

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}$	–	Micrograma
$\mu\text{g/mL}$	–	Micrograma por mililitro
$\mu\text{L}$	–	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	–	Graus Celsius
C	–	Carbono
CH	–	Grupo Metínico
$\text{CH}_2$	–	Grupo Metileno
$\text{CH}_3$	–	Grupo Metil
C-O	–	Carbonila
$\text{DL}_{50}$	–	Dose letal média
Hz	–	Hertz
$\text{IC}_{50}$	–	Concentração inibitória média
cm	–	Centímetro
g	–	Grama
$\text{H}_2\text{SO}_4$	–	Ácido sulfúrico
Hz	–	Hertz
$\text{IC}_{50}$	–	Concentração inibitória média
M	–	Molar
mg	–	Miligramas
$\text{mg/mL}$	–	Miligramas por mililitro
$\text{mg/L}$	–	Miligramas por litro
mL	–	Mililitro
mm	–	Milímetros
$\text{mm}^2$	–	Milímetros quadrados
N	–	Normal
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	–	Sulfato de sódio
NaCl	–	Cloreto de Sódio
NaOH	–	Hidróxido de Sódio
$\text{NH}_4\text{OH}$	–	Hidróxido de amônio
$^{\circ}\text{C}$	–	Graus Celsius
v/v	–	Volume/volume

%	–	Por cento
<	–	Menor que
>	–	Maior que
M	–	Molar



## RESUMO

O presente estudo teve como objetivo extrair e caracterizar as frações obtidas da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, verificar o potencial de aplicabilidade cosmética e biológica, e ainda agregar um valor maior a semente da fruta como aproveitamento de resíduos industriais. Por meio de extração em aparelho soxhlet, foram obtidas as frações hexano, clorofórmio, metanol e acetato de etila, sendo que a fração hexano foi a que apresentou maior rendimento no processo extrativo. O óleo foi caracterizado por CG-EM e CG, revelando um elevado teor de ácido graxo insaturado, principalmente poliinsaturado. Apresentou comportamento reológico pseudoplástico e um ótimo poder de espalhabilidade. A subfração FC2 foi identificada por CG e a FC4 por infravermelho e RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . Caracterizou-se a subfração FC2 como uma mistura de ácidos graxos e a FC4 como uma mistura de dois limonóides identificados como limonina e nomilina. O estudo de algumas atividades biológicas das frações revelou atividade alelopática em relação às sementes de *Lactuca sativa*. A fração metanol desenvolveu toxicidade frente à *Artemia salina*, embora nenhuma fração tenha apresentado atividade hemolítica. A fração metanol demonstrou maior atividade antioxidante quando comparada as outras frações tanto pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio como pela redução do radical DPPH. O extrato bruto não demonstrou atividade antibacteriana sobre as bactérias analisadas. A fração clorofórmio estimulou a enzima tirosinase. As análises indicam que o óleo (fração hexano) possui semelhança aos óleos utilizados na indústria cosmética e alimentícia, sendo valioso para aplicações industriais. Aplicou-se o óleo em três formulações diferentes e foi avaliada a estabilidade, espalhabilidade e análise sensorial destas formulações. A formulação composta por RM 2051<sup>®</sup> apresentou melhor desempenho em relação às demais, porém demonstrou-se ligeiramente irritante pelo método HET-CAM. Realizou-se microencapsulação do óleo para atenuar sua oxidação.

**Palavras chave:** semente, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Rutaceae, antioxidante, tirosinase, toxicidade, alelopatia, dermocosméticos.

## ABSTRACT

This study aims extract and characterize the fractions obtained from the seeds of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, investigate its potential applicability in cosmetics and in biological activities, and also add a greater value to the fruit seed, using its industrial wastes. By extraction in soxhlet, the fractions hexane, chloroform, methanol and ethyl acetate were obtained. The hexane fraction was the one in greater quantity in the extraction procedure. The oil was characterized by GC-MS and GC, revealing a high content of unsaturated fatty acid, mainly polyunsaturated acid, demonstrating pseudoplastic rheological behavior and optimum spread power. The subfraction FC2 was identified by GC and FC4 by IR,  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. FC2 subfraction was characterized as a mixture of fatty acids and FC4 subfraction was a mixture of two limonoids identified as limonin and nomilin. The study of some biological activities of the fractions presented allelopathic activity over the seeds of *Lactuca sativa*. The methanol fraction demonstrated toxicity on *Artemia salina*, although none of the fractions has presented hemolytic activity. The fractions methanol and ethyl acetate showed higher antioxidant activity when compared with the rest of the fractions by the method of reducing the phosphomolybdenum complex and also by the reduction of DPPH radical. The crude extract demonstrated no antibacterial activity on the bacteria analyzed. The chloroform fraction stimulated the tyrosinase enzyme. The analysis indicated that the oil (hexane fraction) is similar to the oils used in cosmetics and food industry, being valuable for industrial applications. The oil was used in three different formulations which evaluated the stability, spreadability and sensory of formulations. The formulation RM 2051<sup>®</sup> performed better than the others and it is slightly irritating by the HET-CAM method. Microencapsulation of the oil was done to mitigate its oxidation.

**Key words:** seed, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, Rutaceae, antioxidant, tyrosinase, toxicity, allelopathy, dermacosmetics.

## 1 INTRODUÇÃO

Há séculos que a humanidade tem evoluído na utilização de plantas medicinais como fonte de uso terapêutico (LORENZI, MATOS, 2002). Entretanto, nos diversos patamares do desenvolvimento da sociedade, a importância dada às plantas assumiu diferentes estágios, conforme a intensidade de seu uso (VALFRÉ, 1990). Desde a época das cavernas a prática do uso de plantas medicinais pelo homem tem avançado ao longo dos tempos, desde as formas mais simples até as formas tecnologicamente sofisticadas da fabricação industrial na atualidade, no entanto, mesmo hoje, esses vegetais são o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (LORENZI, MATOS, 2002).

Atualmente há uma tendência mundial em resgatar hábitos de vida mais saudáveis, o que aumenta a utilização de plantas nas mais variadas formas e usos (PEREIRA, 2008). Isso impulsiona uma maior amplitude de estudos que busquem a caracterização, identificação e isolamento de novos compostos de plantas com propriedades medicinais e atividades farmacológicas. Desta forma é fortalecida a relevância das pesquisas multidisciplinares que agreguem conhecimentos químico, microbiológico, farmacológico e biotecnológico nestes estudos (FOGLIO *et al.*, 2006).

Dentre essas pesquisas com plantas, estudos com a espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (laranja) é relevante tanto como uso farmacêutico ou cosmético. Além da utilização na cura de determinadas doenças, existem registros de antigas civilizações egípcias e chinesas que já faziam o uso de plantas medicinais na área cosmética (PERECIN, BOVI, MAIA, 2002).

*Citrus* é um gênero de grande interesse para a indústria farmacêutica, sendo produzidos em diversos países ao redor do mundo como Brasil, Estados Unidos, Japão, China, México, Paquistão e países da região mediterrânea. Os Estados Unidos lideram a produção mundial com um rendimento médio de 30 toneladas de *Citrus* por hectare seguido pelo Brasil e China, com 20 a 25 e 18 a 20 toneladas de *Citrus* por hectare, respectivamente (MAHMOOD, 2009; KHAN, 2005).

Com esta produção acentuada, cresce a produção das indústrias de transformação, bem como de insumos que conseqüentemente tem aumentada a disponibilidade de subprodutos como as sementes (AKPATA, AKUBOR, 1999). Este

resíduo proveniente do consumo in natura de suco de *Citrus* de laranjas doces (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) pela indústria de alimentos são freqüentemente descartados quando não utilizados como ração animal ou adubo, gerando problemas ambientais. Os benefícios da utilização destes resíduos de maneira eficiente, econômica e segura tornam-se relevantes, pois além dos empregos que possam gerar, agrega valor ao fruto disponível (SCHIEBER, STINTZING, CARLE, 2001; AKPATA, AKUBOR, 1999).

Dentre outras aplicações das sementes, destaca-se o uso de óleos fixos como veículos para aplicação de princípios ativos na pele, principalmente por apresentarem composição semelhante ou idêntica aos lipídios encontrados na pele humana (BRACONI *et al.*, 1995). Portanto, conduzir estudos na aplicação do óleo fixo de sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck na área cosmética é adequado. É interessante avaliar a possibilidade no desenvolvimento de produtos cosméticos contendo óleos vegetais, disponibilizando ao consumidor formulações estáveis e com eficácia comprovada na prevenção e tratamento da pele seca. Isto representa a necessidade de realizar um estudo exaustivo de extração e identificação dos compostos da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, conhecer suas características e avaliar possíveis atividades biológicas e suas aplicações em fitocosmética.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair e caracterizar as frações das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, avaliando a atividade biológica e aplicabilidade do óleo obtido em dermoformulações.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o rendimento das frações obtidas das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em extração por Soxhlet;
- Isolar os constituintes químicos presentes nas frações;
- Identificar os compostos isolados utilizando Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e Cromatografia gasosa (CG);
- Avaliar atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, bioatividade frente à *Artemia salina*, atividade hemolítica, atividade alelopática e atividade da enzima tirosinase das frações obtidas;
- Quantificar os ácidos graxos do óleo das sementes por Cromatografia Gasosa (CG) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM);
- Avaliar densidade, espalhabilidade e o parâmetro de viscosidade do óleo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck;
- Microencapsular o óleo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck;
- Desenvolver formulações cosméticas emulsionadas contendo o óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck;
- Avaliar parâmetros de estabilidade sob diferentes condições;

- Avaliar o potencial de espalhabilidade e sensorial das formulações desenvolvidas elegendo a de maior aceitabilidade para o teste de irritabilidade por meio do teste HET-CAM (Ensaio de irritação em modelo organotípico).

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (LARANJA DOCE)

Muitos cultivares de *Citrus* possui características de híbridos, que dificultam sua classificação taxonômica. Os dois sistemas de classificação mais utilizados são o de Swingle (1967) com 16 espécies reconhecidas e o de Tanaka (1977), com 162 espécies (CARVALHO, 2003). O gênero *Citrus* L. pertence à divisão Magnoliophyta, subdivisão Magnoliophytina, classe Magnoliopsida, subclasse Rosidae, ordem Sapindales (CRONQUIST, 1988), família Rutaceae, subfamília Aurantioideae, na qual existem duas tribos, seis subtribos e 33 gêneros. Os gêneros mais importantes são *Poncirus*, *Fortunella* e *Citrus*, que pertencem à subtribo Citrinae, da tribo Citreae (SWINGLE, 1967).

#### 3.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A FAMÍLIA RUTACEAE

A família Rutaceae é composta por plantas subarborescentes ou arbóreas. Esta família apresenta folhas alternadas, estípulas ausentes, providas de glândulas oleíferas. Possui árvores com espinhos. Inflorescências perfumadas, pentâmeras, ou tretâmeras, diclamídeas, cíclicas, hermafroditas. Ovário súpero com placentação axilar possuindo um a vários óvulos. Fruto seco capsular de um tipo especial, o esperídio (*Citrus*), indeiscente, com grande desenvolvimento de células papiliformes que formam o endocarpo e que se tornam suculentos englobando as sementes (JOLY, 1985).

### 3.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Citrus*

O Gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae sendo composta por 16 espécies como tangerinas (*Citrus reticulata* Blanco), toranjas (*C. grandis* Osbeck), laranja-azeda (*C. aurantium* L.), laranja-doce (*C. sinensis* (L.) Osbeck), limas (*C. aurantifolia* [Christm.] Swingle), cidras (*C. medica* L.), limões (*C. limon* Burm. f.) e pomelos (*C. paradisi* Osbeck) (SWINGLE, 1967). As espécies da família Rutaceae possuem distribuição principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Os *Citrus* são arbustos ou árvores de tamanho pequeno a médio até cerca de 6m de altura, embora algumas espécies podem atingir 15m. Enxertos podem afetar significativamente a altura da árvore. As árvores possuem casca fina, lisa, cinza a marrom-esverdeada (MANNER *et al.*, 2006).

Os representantes de *Citrus* apresentam incompatibilidade sexual, o que possibilita a origem natural dos híbridos intergenéricos e interespecíficos ao longo do processo de evolução do grupo. Desta forma, existe complexidade filogenética e taxonômica, isto deve-se a particularidades de sua biologia reprodutiva e a sua ampla história de cultivo. Podem ser observadas em espécies de *Citrus* variações morfológicas em folhas, flores e, principalmente, em frutos (MAGALHÃES JUNIOR, NEGRI, PALHARES JUNIOR, 2005).

As flores são brancas e aromáticas e frutos do tipo baga, contendo vesículas preenchidas por um suco de grande interesse comercial (Figura 1 e 2) (MAGALHÃES JUNIOR, NEGRI, PALHARES JUNIOR, 2005).



Figura 1 – Flor de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: [http://www.escience.unicamp.br/nefmd/admin/images/projeto\\_610\\_DSC\\_0504.JPG](http://www.escience.unicamp.br/nefmd/admin/images/projeto_610_DSC_0504.JPG)



O fruto maduro pode ser oblado, esférico, ovóide ou mesmo periforme, de diversos tamanhos, com diâmetros variando até 30 cm. A coloração da casca pode variar do amarelo ao verde, como nas limas, até ao vermelho-alaranjado, como nas tangerinas (Figura 2) (SWINGLE, 1967).



Figura 2 – *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: [http:// monoimonoi.blogspot.com/p/curiosidades.html](http://monoimonoi.blogspot.com/p/curiosidades.html)

A casca ou epicarpo é diferenciado em um exocarpo compacto, colenquimatoso, o flavedo, e um mesocarpo esponjoso, o albedo (ESAÚ, 1974). No flavedo, encontra-se uma cutícula constituída de cera que irá controlar a difusão de água e de compostos químicos para o meio ambiente e um suporte estrutural formado por polímeros que irão proteger o fruto contra o ataque de microrganismos. Carotenóides contribuem na coloração da casca e óleos essenciais que dão aroma ao fruto. Os constituintes monoméricos majoritários do flavedo são ácidos graxos hidroxilados com 16 átomos de carbono (FANG *et al.*, 2001). No flavedo podemos encontrar glândulas com flavonóides polimetoxilados (MOULY, GAYDOU, ARZOUYAN, 1999). O albedo é formado por pectina e a parede celular constitui a

porção geralmente branca e esponjosa da casca (ARDLE, LETOURNEAU, STEPHEN, 2000).

As sementes (Figura 3) possuem, além de embrião sexual, embriões nucelares, também chamados de assexuais, agâmicos, adventíceos, apomíticos ou somáticos. O número de sementes por fruto varia de zero a 25 (MAGALHÃES JUNIOR, NEGRI, PALHARES JUNIOR, 2005).



Figura 3 – Sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: <http://thegardengeeks.com>

Os representantes desse gênero possuem um conjunto básico cromossômico  $x=9$ , sendo relatados poucos indivíduos triplóides na natureza (MAGALHÃES JUNIOR, NEGRI, PALHARES JUNIOR, 2005).

### 3.3.1 Origem de *Citrus*

Os representantes desse gênero são originários da Ásia e, devido às condições favoráveis para o seu desenvolvimento, foram introduzidos no Brasil pelos portugueses (COSTA, 2000). Os *Citrus* estão entre as mais importantes árvores frutíferas do mundo e o seu processo de produção e consumo tem aumentado consideravelmente desde os meados da década de 1980 (STEUER, SCHULZ, LAGER, 2001). Os frutos são colhidos em muitos países com clima tropical ou

subtropical e os principais produtores são Brasil, China, Japão, México, Paquistão, Estados Unidos e os países da região do mediterrâneo.

### 3.3.2 Aspectos econômicos

A produção citrícola mundial é de cerca de 105 milhões de tonelada por ano e os frutos desse gênero são principalmente processados para o sumo. A citricultura brasileira se destaca e apresenta um potencial competitivo dentre as atividades agroindustriais (CARVALHO, 2003). Detendo 30% da produção mundial de laranja e 59% de suco do fruto, o Brasil movimentava R\$ 9 bilhões por ano com a geração e manutenção de mais de 400 mil empregos diretos e indiretos (JANK, NEVES, 2006). Isso deve-se ao fato do aumento do consumo de produtos naturais levando o país à liderança mundial na exportação de suco de laranja concentrado (LUZIA, JORGE, 2009; FERNANDES *et al.*, 2002).

Devido a seus variados usos os frutos de *Citrus* possuem relevância econômica para o país (STEUER, SCHULZ, LAGER, 2001), pois os óleos essenciais obtidos são amplamente utilizados na indústria alimentícia, bem como as indústrias de perfumes e fragrâncias (SCHULZ *et al.*, 2002). Além disso, esses óleos são utilizados em desodorantes, sabonetes, detergentes, componentes de medicamentos, antissépticos e em aplicações de aromaterapia. Não obstante, a importância dos cítricos não está somente no óleo essencial extraído das cascas, mas também nos componentes de suas sementes que possuem algumas atividades biológicas já estudadas (SAIDANI, DHIFI, MARZOUK, 2004).

Os resíduos da indústria de suco, como cascas, sementes e polpas, que representam cerca de 50% das frutas, é uma fonte potencial de valiosos subprodutos (ANWAR *et al.*, 2008). Estes poderiam ter outras utilidades ao ser humano e, consequentemente ao meio ambiente (KOBORI, JORGE, 2005).

Como as sementes de *Citrus* habitualmente são consideradas resíduos agro-industriais e esporadicamente são utilizados como ração animal ou fertilizante, o custo de secagem e transporte para esse fim é fator economicamente limitante. Convém citar que a porção descartada no meio ambiente representa um problema ambiental crescente (KOBORI, JORGE, 2005).

### 3.3.3 Importância sanitária e atividades biológicas do *Citrus*

Estudos epidemiológicos têm relatado resultados benéficos à saúde na associação da dieta com consumo de frutas e produtos hortícolas, com a redução de risco para algumas doenças como diabetes, doenças crônicas, câncer, doenças cardiovasculares e Alzheimer (ABEYSINGHE *et al.*, 2007).

Os consumidores estão cada vez mais conscientes em relação ao valor nutricional e a segurança dos alimentos. A preferência por produtos naturais ocorre porque acredita-se ser mais seguro e saudável (FARAG *et al.*, 1986).

Essa tendência de consumo dos produtos naturais deve-se à preocupação da prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (GARDNER *et al.*, 2000), pois nos últimos anos foi notado um aumento no consumo destes produtos incentivando uma grande expansão da agroindústria de frutas e hortaliças, principalmente na indústria de sucos brasileira (BRANCO *et al.*, 2007).

Os frutos e produtos hortícolas em geral contêm diferentes componentes antioxidantes. Os flavonóides, incluindo flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas, e isocatequinas são componentes presentes nestes produtos (HANASAKI, OGAMA, FUKUI, 1994).

Devido a sua excelente atividade antioxidante e suas funções biológicas, alguns autores referem os flavonóides como substitutos de antioxidantes sintéticos que podem proporcionar vantagens tecnológicas, científicas, nutricionais e medicinais (ALVAREZ *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-VALVERDE, PERIAGO, ROS, 2000). No entanto, o uso destes antioxidantes naturais é limitado pela falta de conhecimento sobre sua composição molecular, quantidade de ingredientes ativos e a disponibilidade de dados relevantes de toxicidade (SHAHIDI; WANASUNDARA, AMAROWICJ, 1994).

Já foram encontradas outras atividades relacionadas a estes flavonóides como: anticancerígeno, antivirais, atividades antiinflamatórias, efeitos sobre a fragilidade capilar, capacidade de inibir agregação plaquetária e uso como repelente (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997).

Os flavonóides aparecem entre os metabólitos secundários presentes frutos cítricos e constituem o grupo de grande importância dentro dos compostos fenólicos. Também podem ser encontradas nas frutas cítricas 6 a 12% de glicídios, elevadas

quantidades de compostos nitrogenados, vitaminas C e cálcio, bem como ferro, fibras e outros sais minerais. O teor de gorduras, em contrapartida, é baixo, oscilando entre 0,2 e 0,5% (MOULY, GAYDOU, ARZOUYAN, 1999).

Os frutos cítricos são conhecidos por conterem antioxidantes naturais derivados do óleo, polpa, sementes e cascas (LUZIA, JORGE, 2009). Duda-Chodak, Tarko, (2007) ao comparar a atividade antioxidante de cascas e sementes de frutas cítricas consumidas na Polônia, percebeu que as cascas possuem maior capacidade de seqüestrar radicais livres e maior concentração de polifenóis que as sementes.

Ambas as cascas e as sementes são fontes de compostos fenólicos, que incluem ácidos fenólicos e flavonóides. Flavonóides são representados nas frutas cítricas por duas classes de compostos: flavonas polimetoxiladas e flavanonas glicosilada. Seu padrão é específico de cada espécie, o que os torna bom marcadores de adulteração em sucos comerciais (OOGHE, DETAVERNIER, 1997). Além disso, alguns flavonóides de *Citrus* e seus derivados, no campo da tecnologia alimentar, são conhecidos principalmente pela capacidade de proporcionar um sabor amargo ou inibidor da amargura (BENAVENTE-GARCIA *et al.*, 1997).

Vários antioxidantes naturais foram isolados das sementes de oleaginosas, cereais, produtos hortícolas, frutos, folhas, raízes, especiarias e ervas (JAYAPRAKASHA, TAMIL SELVI, SAKARIAH, 2003). Compostos antioxidantes também foram identificados nas sementes de *Citrus* (GORINSTEIN *et al.*, 2001), uva (JAYAPRAKASHA, SINGH, SAKARIAH, 2001) e romã (SINGH, MURTHY, JAYAPRAKASHA, 2002). No entanto, existe pouca informação disponível sobre estudos relacionados à atividade antioxidante da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Atualmente existe crescente demanda por antioxidantes naturais e inúmeras investigações científicas especialmente entre os frutos. Todavia, apenas alguns deles envolvem resíduos de frutos, sementes e cascas. Esforços têm sido feitos para melhorar os métodos para utilização destes resíduos. A concorrência entre os antioxidantes naturais e sintéticos, em termos de consumo, aceitação, as necessidades legais de acesso ao mercado, à toxicidade e estabilidade térmica, além do melhor método de extração, são os problemas da não utilização adequada dos resíduos até o momento (DUDA-CHODAK, TARKO, 2007).

### 3.3.3.1 Considerações sobre a composição química do óleo de *Citrus*

O óleo essencial de laranja obtido pela condensação dos vapores durante o processo de concentração do suco é constituído basicamente por uma mistura de hidrocarbonetos terpênicos quimicamente instáveis e por compostos oxigenados que representam 5 a 10% do referido óleo (ASCHERI, 1999).

Além do óleo volátil presente nas frutas cítricas, as sementes pertencentes a este gênero também possuem óleo fixo composto basicamente por triacilgliceróis e, em menor quantidade, por ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis e matéria não gordurosa como limonina e naringina (KOBORI, JORGE, 2005; REDA *et al.*, 2005; GIANNUZZO *et al.*, 2000;).

Os ácidos graxos são características importantes do óleo da semente de *Citrus*. Várias pesquisas foram realizadas sobre a composição do óleo fixo, os principais ácidos graxos encontrados foram: palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoleico e linolênico (KOBORI, JORGE; 2005).

A limonina é um limonóide característico do gênero *Citrus*, foi o primeiro limonóide a ser isolado, desta forma o termo limonóide foi derivado desta substância (MURPHY, 2008).

A naringina é um flavonóide (flavanona glicosilada), que é extraído da casca de alguns *Citrus* e é o principal responsável por seu sabor amargo. Também está presente na polpa dos frutos, folhas, flores e sementes da planta (GIANNUZZO *et al.*, 2000). Certos flavanonas glicosídeos amargos ou sem gosto podem ser transformados pela abertura do anel na hidrogenação chalcona que mais tarde se transforma em diidrochalcona, consistindo no poder edulcorante igual ou superior a sacarina (ALVAREZ *et al.*, 2004).

### 3.3.3.2 Limonóides e suas atividades biológicas

O perfil químico do gênero *Citrus* é caracterizado pela presença de cumarinas, flavonóides, alcalóides e limonóides (RIBEIRO, 2006).

Limonóides são triterpenos modificados chamados de tetranortriterpenoides, com 26 átomos de carbono, encontrados na Rutaceae e família Meliaceae. Dentre

37 limonóides relatados em *Citrus* e seus híbridos, limonina é o grande responsável pela amargura retardada em sucos de *Citrus* e produtos transformados (OZAKI *et al.*, 1991). Sua rota biossintética tem origem em um triterpeno que gera um tetranortriterpenóide pela perda de quatro átomos de carbono do precursor original, essa rota envolve várias reações que levam a formação de diferentes estruturas, mas que, geralmente, possuem 26 átomos de carbono no esqueleto básico (SIMÕES, 2007).

Os limonóides são conhecidos pelo fato de apresentarem atividade contra insetos, seja interferindo no seu crescimento, seja pela inibição na ingestão de alimentos possuem importantes atividades biológicas tais como a inibição de crescimento de tumores cancerígenos, existem estudos como antibacterianos, antifúngicos, antimaláricos, antivirais e uma série de outras atividades farmacológicas (MURPHY, 2008; ROY, SARAF, 2006; OZAKI *et al.*, 1991,).

Recentemente, estes metabólitos secundários têm recebido muita atenção, por sua complexidade estrutural e atividade diversificada (GARCÍA 2004).

Dentre as pesquisas de compostos isolados de *Citrus* várias foram as espécies pesquisadas por Ozaki *et al.* (1991), no qual foram identificados os glicosídeos limonóides. Todas as sementes estudadas continham 17- $\beta$ -D - glucopiranosídeos de limonina, nomilina, obacunone, deacetilnomilina, ácido nomilínico e ácido deacetilnomilínico. O conteúdo total glucosídeos limonóides variou 0,31-0,87% do peso seco. A concentração de glicosídeo nomilina foi maior entre os glicosídeos encontrados nas sementes. Todas as sementes também continham limonóides agliconas comumente encontrados em *Citrus*, ou seja, limonina, nomilina, deacetilnomilina, obacunone e ichangin.

### 3.4 ÓLEOS VEGETAIS E APLICAÇÃO COSMÉTICA

A maior parte dos óleos e gorduras é constituída de triacilglicerídeos, que são ésteres formados de glicerol e três ácidos graxos e em menor quantidade mono e di-glicerídeos; ácidos graxos livres; tocoferol; esteróis e vitaminas de gorduras solúveis (FARIA *et al.*, 2002).

Os ácidos graxos são normalmente compostos por cadeia reta com o nº par de C na molécula, mas também existe ácidos ímpares, cadeias ramificadas e cíclicas (GIOIELLI, 1996). Estes ácidos graxos podem ser insaturados e saturados. O ácido saturado mais importante é o ácido esteárico (C18:0) e os insaturados mais importantes são: ácido oléico, ácido linoleico e ácido linolênico. A maioria dos óleos vegetais contém uma grande quantidade de ácidos graxos mono ou poliinsaturados (FARIA, 2002).

Os ácidos graxos saturados e insaturados na constituição natural de óleos fixos conferem propriedades emolientes quando incorporados em dermoformulações. Desta forma, são amplamente utilizados em formulações cosméticas e farmacêuticas, devido sua inerente propriedade emoliente que, quando em contato com a pele, não forma película contínua. Esta propriedade deve-se à tensão superficial e imiscibilidade com a água que possibilita distribuição em gotículas nos espaços interfoliculares e entre os poros sudoríparos. Desta forma o óleo em contato com a camada córnea torna a pele macia e com toque agradável (OLIVEIRA, BLOISE, 1995).

Vale ressaltar que é extremamente importante o cuidado com a estabilidade destes óleos, já que estes são possíveis de oxidação, principalmente os óleos que possuem quantidade maior de ácidos graxos insaturados que são bastante instáveis em comparação com os saturados.

### 3.5 PELE

A pele ou tegumento externo, limite anatômico do organismo animal, é o mais acessível e o maior sistema orgânico do corpo. Constitui um revestimento barreira funcional, eficiente contra agressões externas provocadas por microorganismos e radiação como também internas, prevenindo a perda de água e de proteínas para o exterior, sem a qual a vida se tornaria impossível. A pele é maleável, elástica, irregular, desigual. Pode ser lisa ou rugosa, glabra ou pilosa (KEDE, 2004; PERSSONELLE, 2004; HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999; CHIEN, 1992; VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989).



A pele também age como órgão sensorial e nela se verificam com grande precisão os sintomas de dor, tato, calor e frio, alertando o organismo para que elabore a resposta correspondente (VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989). A pele é uma espécie de “espelho” que reflete e amplifica as reações do organismo pouco acessíveis à investigação (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999). Nela se refletem os sentimentos e emoções, como vergonha ou angústia (rubor), medo (palidez, ereção dos pelos pela contração dos pequenos músculos cutâneos) e ansiedade (sudoração) (VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989). Além disso, participa do sistema imunológico e exerce outras funções, como a regulação da temperatura corpórea, a produção de vitamina D3, a excreção de eletrólitos e outras substâncias e confere uma proteção relativa contra insultos físicos (KEDE, 2004; PERSSONELLE, 2004; OBAGI, 2004).

Embora represente menos de 15% do peso do corpo sua extensão corresponde a uma área de aproximadamente dois metros quadrados, recebendo um terço do total de sangue circulante pelo corpo (KEDE, 2004; CHIEN, 1992; VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989). Segundo Obagi (2004) corresponde a 20% do peso corporal.

A pele apresenta variações em sua espessura decorrentes da mobilidade, atrito ou pressão a que está sujeita de acordo com sua localização topográfica (VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989). Não há um consenso entre os autores, mas, no geral, a espessura total da pele varia de 1,5 a 4 mm (PERSSONELLE, 2004);  $2,97 \pm 0,28$  (CHIEN, 1992); 0,5mm na nuca a 5mm na planta dos pés (HERNANDEZ; MERCIER-FRESNEL, 1999) e assim se compreende que uns poucos milímetros separam a subjacente rede de circulação sanguínea e os órgãos viáveis do meio externo (CHIEN, 1992).

De origem ectodérmica e mesodérmica (KEDE, 2004), microscopicamente a pele é um órgão multiestratificado composto de, anatomicamente, muitas camadas histológicas (CHIEN, 1992). Entretanto, geralmente é descrita em termos de três camadas teciduais que em corte perpendicular de fora para dentro, denominam-se epiderme (tecido epitelial estratificado), derme (tecido conjuntivo) e hipoderme (tecido conjuntivo adiposo subcutâneo). A hipoderme não é considerada por muitos autores como parte integrante da pele, embora seja estudada dentro do sistema tegumentar. A pele possui penetrações verticais dos apêndices, tais como o folículo piloso e as glândulas sudoríparas e sebáceas (PERSSONELLE, 2004; OBAGI,

2004; KEDE, 2004; BAUMANN, 2002; HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999; CHIEN, 1992; VIGLIOGLIA, RUBIN, 1989).

### 3.5.1 Constituição da pele

Estruturalmente a pele possui uma série de camadas, há três grandes divisões (Figura 4): epiderme (tecido epitelial estratificado), derme (tecido conjuntivo) e hipoderme (tecido conjuntivo adiposo) (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999).

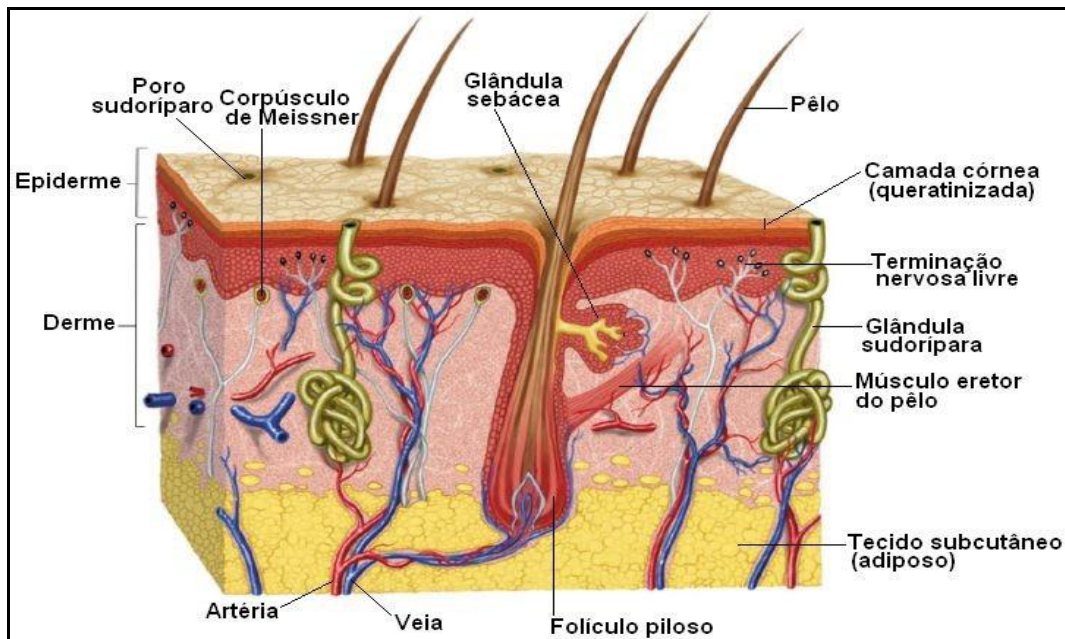


Figura 4 – Estrutura da Pele

Fonte: <http://rulibra-cap.com.br/blog/wp-content/uploads/2009/08/pele.jpg>

A epiderme é formada de epitélio pavimentoso estratificado composto de camadas tissulares onde, da mais profunda em direção a superfície, temos a camada basal, espinhosa, granulosa e córnea (ROSS, REITH, ROMRELL, 1993). Esta camada é muito importante no ponto de vista cosmético porque esta camada que contribui para a cor da pele e dá a pele sua textura e umidade (BAUMANN, 2002).

A derme é um tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. A derme apresenta espessura variável de acordo com região observada e compreende um

verdadeiro gel rico em polissacarídeos, substância fundamental e material fibrilar composto de fibras elásticas, colágenas e reticulares (SAMPAIO, RIVITTI, 2001). É o elemento de sustentação e nutrição da epiderme e seus anexos divide-se em derme superficial ou papilar e derme profunda ou reticular (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele e se localiza entre a derme e os órgãos profundos (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999). É constituída de tecido adiposo e conjuntivo (CUZZI-MAYA, PIÑEIRO-MACIEIRA, 2001) Possui funções importantes, entre as quais se destacam reserva de gordura, mobilização de gordura ou lipólise, função energética (em caso de necessidade a lipólise libera rapidamente os ácidos graxos), função na termogênese, função de proteção mecânica de amortecimento (HERNANDEZ, MERCIER-FRESNEL, 1999).

### 3.6 EMULSÕES

Emulsões são definidas como um meio líquido ou pastoso que constituem-se de sistemas heterogêneos no qual a menos um líquido imiscível está disperso em outro na forma de gotículas (BARATA, 1994). São utilizados como produtos cosméticos e dermatológicos em função de terapêuticas, e como veículos para transportar fármacos e agentes cosméticos através da pele (ECCLESTON, 1997).

As duas fases não miscíveis (água/óleo) entre si com ajuda de um tensoativo (emulsionante) formam um sistema homogênea (LEONARDI, CHORILLI, 2008). Visualmente a emulsão apresenta-se homogêneo, mas na verdade quando visualizado em microscópio esta apresenta gotículas. As gotículas constituem a fase dispersa e o líquido a fase dispersante (BARATA, 1994).

Desta forma a emulsão apresenta-se composta por gotículas da fase dispersa (ou interna) envolta pela fase contínua (ou externa). As emulsões simples podem ser classificadas em água em óleo (A/O), quando as gotículas da fase aquosa estão dispersas numa fase contínua oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas numa fase contínua aquosa (BARATA, 2004). Para classificar a emulsão em O/A ou A/O não é avaliado a quantidade de

componentes hidro e lipossolúveis, o que determinada esta característica é o emulsionante utilizado. Desta maneira as emulsões são compostas por três fases: fase aquosa, fase oleosa e agente emulsificante (LEONARDI, CHORILLI, 2008).

### 3.6.1 Estabilidade das emulsões

A procura por produtos cosméticos com boa qualidade e seguro está exigindo da comunidade científica estudos cada vez mais complexos e utilização de técnicas mais eficientes para determinação da estabilidade dos produtos. Mesmo não existindo um padrão para realização da estabilidade de produtos cosméticos, estudos acadêmicos vêm sendo realizados. Nesse sentido, o estudo reológico é uma importante característica a ser considerado no desenvolvimento de cosméticos, com avaliação desta natureza é possível detectar sinais precoces de instabilidade da formulação. A análise térmica e análise física química também são usadas para auxiliar o estudo da estabilidade de produtos cosméticos (ISAAC *et al.*, 2008).

A estabilidade é um parâmetro de validação muito pouco descrita em normas de validação de metodologia analítica (VILEGAS, CARDOSO, 2007), mas necessária para assegurar a qualidade do cosmético.

Várias são as causas que acarretam a instabilidade do produto: temperatura de emulsificação, variáveis relacionadas à formulação, velocidade de resfriamento, intensidade de agitação, ordem de adição de matérias-primas, material de acondicionamento e às condições ambientais e de transporte (LEONARDI, CHORILLI, 2008).

As análises de estabilidade fornecem informações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que este possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. Para os testes de estabilidade, as condições mais comuns são: temperatura (elevada, do ambiente e baixa), exposição à luz e ciclos de congelamento e de descongelamento (BRASIL, 2004).

O pesquisador que julga como será avaliado o produto de acordo com os componentes e características do mesmo. Podem ser avaliados de acordo com as

seguintes análises: organolépticos, físico-químicos, centrifugação e microbiológicos (BRASIL, 2007).

Normalmente os produtos são avaliados por testes preliminares e posteriormente se permanecerem estáveis pode ser submetido ao Teste de Estabilidade acelerada (ISAAC *et al.*, 2008).

### 3.7 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é utilizada como ferramenta para proteção e modulação da liberação de substâncias (GONSALVES *et al.*, 2009). Neste processo pode ocorrer o encapsulamento de partículas sólidas, gotículas de líquidos e gases em camadas de polímero finas. As vantagens da utilização deste sistema incluem proteger o ativo contra degradações por diminuir seu contato com o restante da formulação; estabilidade e proteção contra oxidação e fotodegradação e mascarar sabor, odor (PASQUALIM *et al.*, 2010; JACKSON, LEE, 1991). De acordo com GONSALVES *et al.*, (2009), a baixa estabilidade dos óleos vegetais, devida oxidação dos constituintes, desfavorece sua utilização direta sendo necessária a sua microencapsulação.

Microcápsulas são sistemas poliméricos sólidos e esféricos de tamanho variando entre 1 e 1000  $\mu\text{m}$ . Podendo defini-las como microcápsulas nanotecnológicas ou microcápsulas macroscópicas (PASQUALIM *et al.*, 2011).

A microencapsulação é amplamente utilizada em vários setores, principalmente na área farmacêutica e médica, para encapsulação de fármacos instáveis e irritantes ou na preparação de sistemas de liberação (OLIVEIRA, 2006; SHAHIDI, 1993).

Por meio deste processo é possível converter líquidos em sólidos, mascarar odor e sabor, alterar propriedades de colóides e de superfície, proteger fármacos das condições ambientais e do trato gastrointestinal, melhorar estabilidade de fármacos, modular características de liberação e proporcionar liberação sítio específica (OLIVEIRA, 2006; NADIAN *et al.*, 2002).

A técnica de microencapsulação depende das propriedades físicas e químicas do material a ser encapsulado. Vários aspectos devem ser verificados no desenvolvimento de microcápsulas, tais como, natureza, estabilidade do material a ser encapsulado, características do polímero encapsulador, processo de microencapsulação e características do produto a ser obtido. Também devem ser avaliados os materiais utilizados. Estes materiais podem ser de origem natural, semi-sintética, sintética, biodegradáveis ou não, no qual podemos citar a goma arábica, alginato, os carboidratos, amido, maltodextrina, proteínas, caseína, gelatina, derivados de celulose, carboximetilcelulose, etilcelulose e os polímeros derivados do ácido acrílico e metacrílico (JACKSON, LEE, 1991).

Estes materiais devem oferecer algumas propriedades de revestimento, tais como: resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade (OLIVEIRA, 2006).

Polímeros naturais têm despertado o interesse dos pesquisadores devido às vantagens que apresentam tais como a facilidade de obtenção, baixa toxicidade, maior biodisponibilidade e melhor biocompatibilidade (CHEN *et al.*, 1987).

## 4 METODOLOGIA

Realizou-se no presente trabalho uma pesquisa qualitativa experimental aplicada, realizadas em duas fases distintas.

A primeira etapa traduz a importância da utilização das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em processos industriais e demonstra o processo de fracionamento deste resíduo, submetidas a técnicas de isolamento e caracterização de compostos químicos e atividades biológicas das frações obtidas.

A segunda fase aborda a aplicabilidade do óleo obtido em formulações cosméticas. Foram formuladas três diferentes emulsões com 2% de óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e posteriormente realizou-se um estudo comparativo de estabilidade, espalhabilidade e sensorial, além da análise de irritabilidade da emulsão selecionada. Também foi realizado o microencapsulamento do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com a finalidade de redução de oxidação do óleo.

A Figura 5 esquematiza o fluxograma da pesquisa, sequência da metodologia aplicada na primeira fase do trabalho e a Figura 6 ilustra cada passo da metodologia aplicada na segunda fase.

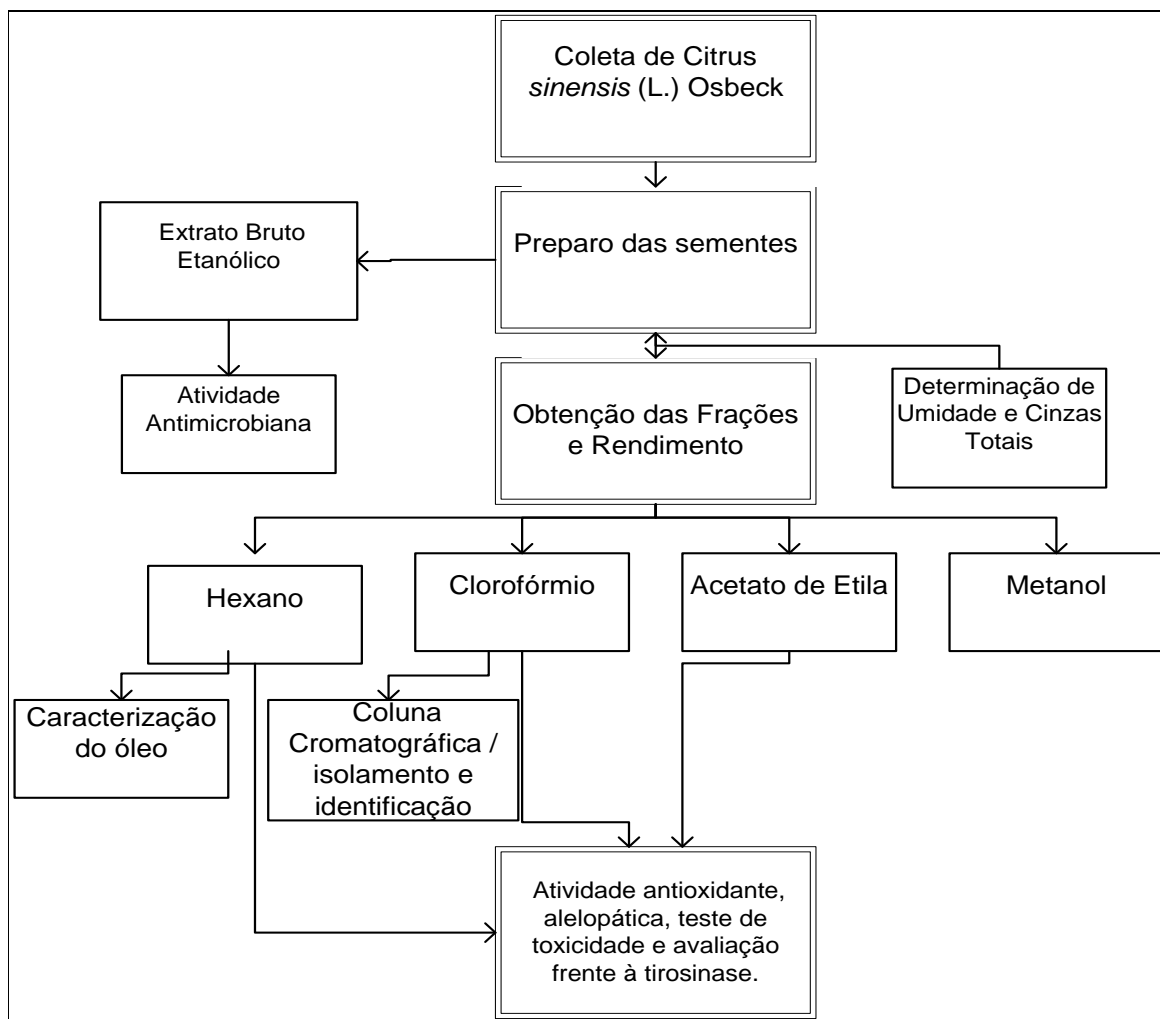


Figura 5 – Fluxograma da metodologia aplicada na primeira fase da pesquisa



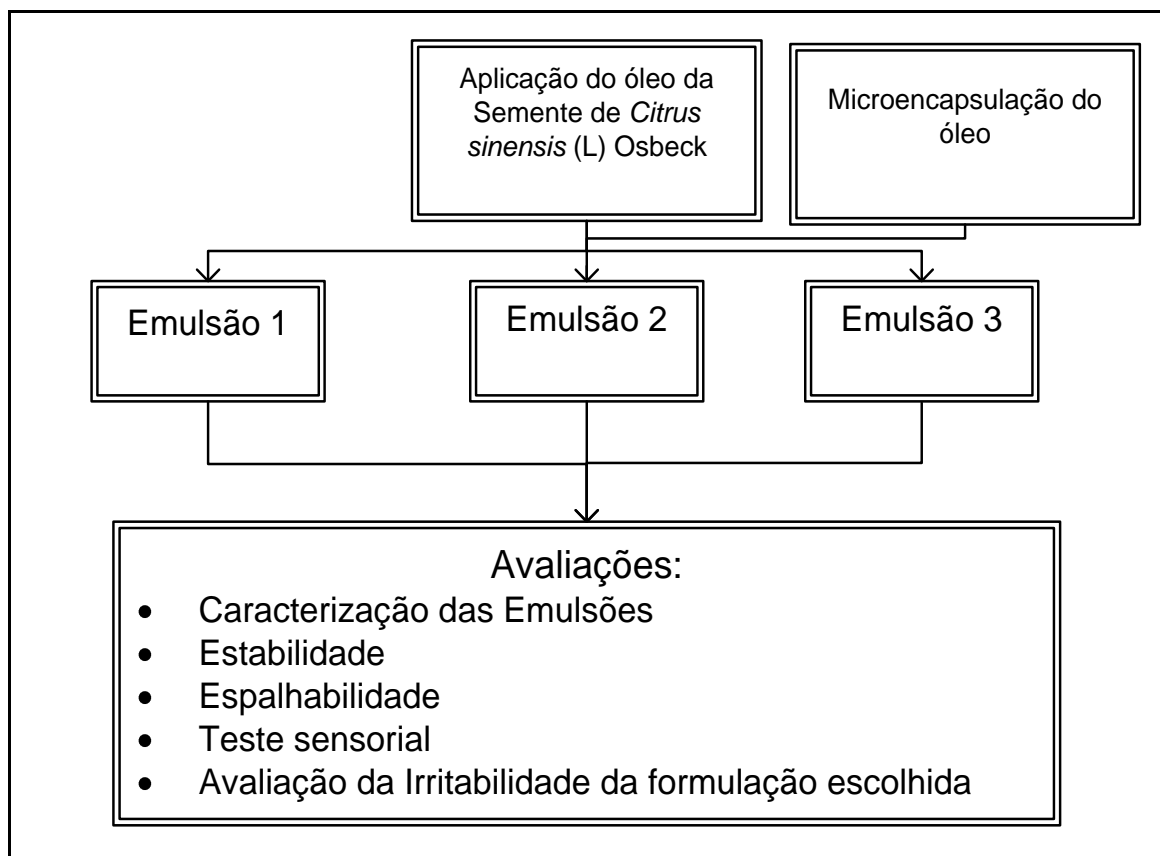


Figura 6 – Fluxograma da metodologia aplicada na segunda fase da pesquisa

#### 4.1 PRIMEIRA FASE: DA COLHEITA DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck À AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FRAÇÕES

##### 4.1.1 Método de obtenção das sementes

Foram selecionadas 650 unidades de laranjas (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Estas foram coletadas no Sítio Montanha (Figura 8), lote 08, na cidade de Jardim Alegre (Figura 7), no estado do Paraná, Brasil. A identificação da espécie botânica [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] provedora das sementes, foi realizada pelo botânico Dr. Gert Hatschbach, do Museu Botânico Municipal (MBM) da prefeitura do município de Curitiba-PR e registrado sob numeração 11.784. As sementes foram removidas dos frutos manualmente, lavadas com água potável e secas a 40 °C em uma estufa com circulação de ar forçada por 19 horas.

As sementes foram armazenadas em frasco de vidro, fechado e identificado, ao abrigo da luz em temperatura ambiente.



Figura 7 – Local de Coleta de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck  
Fonte: [pt.wikipedia.org/wiki/Jardim\\_Alegre](http://pt.wikipedia.org/wiki/Jardim_Alegre)



Figura 8 – Árvores de coleta de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck  
Fonte: A autora, 2009

#### 4.1.2 Determinação da umidade

Utilizou-se o método gravimétrico da farmacopéia (1988) para determinação de umidade das sementes.

Pesou-se um grama do material em triplicata, em cadinho de porcelana previamente seco. O material pesado foi secado em estufa a 100-105°C durante 3 horas e após resfriado em dessecador, e novamente pesado. O processo de secagem foi repetido até peso constante não diferindo por mais de 5mg entre as duas últimas pesagens (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 4.1.3 Determinação das cinzas totais

Para determinação de cinzas totais da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foi realizado o método descrito pela Farmacopéia (1988). Este processo tem como objetivo estabelecer a quantidade de substância residual não volátil no processo de incineração.

Previamente o cadinho de porcelana foi calcinado em mufla a 450°C por 30 minutos e resfriado em dessecador. Pesou-se no cadinho tarado 1g da semente. Incinerou-se em mufla 450°C por duas horas e em seguida o cadinho com o material calcinado foi colocado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação à semente seca.

#### 4.1.4 Obtenção das frações

As sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foram secas, trituradas em moinho de facas, e colocadas em um extrator Soxhlet (Figura 9). Este processo de

extração requer o emprego de um cartucho de papel onde é acondicionado o material vegetal. O cartucho é colocado no extrator acrescentando-se o solvente, que recobre a amostra. Todo o sistema é conectado a um condensador. O processo de extração contínuo acontece quando o solvente colocado em um balão sob aquecimento entra em ebulição, é condensado e percola pelo cartucho, retornando novamente para o balão carreando o material solubilizado. O processo de extração foi de aproximadamente 6 horas. O volume utilizado de solvente foi de 200 mL no cartucho e de 300mL no balão (FALKENBERG, SANTOS, SIMÕES, 1999).

Foram utilizados solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol identificadas respectivamente como fração hexano (FH / óleo), clorofórmio (FC/ FCL), acetato de etila (FAC) e metanol (FM).

Após a extração com hexano, foram realizadas com a mesma amostra, extrações com clorofórmio, acetato de etila e metanol, sucessivamente, nas mesmas condições de processo.

As frações foram filtradas, levadas ao banho-maria até a secar a 40°C e pesado.

Os rendimentos foram obtidos considerando o peso inicial das sementes secas e trituradas.



Figura 9 – Extrator de Soxhlet

Fonte: A autora, 2009

#### 4.1.5 Isolamento e caracterização dos compostos

As frações obtidas foram eluídas em coluna cromatográfica de vidro de 16 cm x 4,5cm, com sílica gel 60 Merck (70-230 mesh) na proporção de 5 partes em relação à quantidade de amostra e fase móvel de polaridade crescente, hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol respectivamente (Figura 10).

O sistema eluente iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila e metanol como gradientes de polaridade com variação de 5%.

Apenas a fração clorofórmio foi submetida à cromatografia em coluna de sílica, permanecendo a fração metanólica e acetato de etila para serem trabalhadas posteriormente.

Foram coletadas subfrações de aproximadamente 20 mL em frascos de vidro e trabalhadas em temperatura ambiente para isolamento. O perfil das amostras foi realizado por CCD e após encaminhada para identificação.



Figura 10 – Coluna cromatográfica  
Fonte: A autora, 2010

Os compostos isolados foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  e infravermelho (IV) e cromatografia gasosa.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em Espectrômetro de RMN modelo Bruker Advance 400 MHz e 100 MHz, utilizando-se solvente deuterado e TMS como padrão interno de referência.

As amostras para infravermelho foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro (KBr) comprimidas em equipamento Bomem-Hartmann & Braum MB-serie e analisadas em aparelho BioRed® FTS 3500 GX entre 400 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.1.5.1 Identificação do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

##### 4.1.5.1.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Para proceder à análise do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foi realizado derivatização. Após derivatização dos ácidos graxos presentes no óleo a ésteres metílicos e através de um Cromatógrafo a gás acoplado a Espectrômetro de Massa (CG-EM), marca Varian 4000 foram detectados os picos correspondentes aos ácidos graxos saturados e insaturados pelos respectivos tempos de retenção, espectro de fragmentação de massas.

Por esta técnica faz-se a separação de substâncias voláteis que são arrastadas por uma corrente gasosa através de uma fase estacionária. A detecção por massas foi feita por meio de ionização eletrônica (70eV) e analisador do tipo íon trap. A temperatura do injetor foi mantida em 250°C e do trap em 200°C. Foi utilizado como gás de arraste o Hélio 5.0 analítico, a um fluxo de 1mL/min. As análises foram realizadas em coluna capilar VF1.MS (30 metros, espessura 0,25mm e diâmetro interno 0,25 micrometro), sendo a temperatura inicial do forno da coluna de 50°C e a programação com 1º estágio de 160°C, espera 2 min, taxa de aquecimento 5°C /min durante 3 min. O 2º estágio com 280°C taxa de aquecimento 5°C /min durante 50 min e o 3º estágio com 310°C, taxa de aquecimento 3°C /min durante 65 min.

#### 4.1.5.1.2 Cromatografia gasosa

Também foram identificados os ácidos graxos por cromatografia gasosa, desta forma detectados os picos correspondentes aos ácidos graxos saturados e insaturados. Foi utilizada cromatógrafo gasoso da Agilent, mod. 6850, software EZChrom SI, detector FID e uma coluna de aço inoxidável DB-23 (60m x 0,25 diâmetro interno x 0,25 filme) com fase estacionária (50% cianopropil)-metilpolisiloxano.

Pesou-se 100 mg óleo e adicionado 10 mL Hexano e 100 µL KOH 0,2 N agitando-se em vórtex por 5 minutos. Deixou-se decantar a glicerina e adicionou-se o sobrenadante direto no vial. Foi injetado 1 µL da amostra. A amostra foi cromatografada sob as condições de fluxo de 30 ml/ min (Gás Hidrogênio), temperatura do injetor 250°C, temperatura do detector de 280°C.

#### 4.1.6 Análises físico-químicas do óleo (Fração hexânica)

##### 4.1.6.1 Parâmetro reológico de viscosidade

O parâmetro reológico de viscosidade do óleo foi determinado em equipamento Brookfield, modelo DV III, com cone coaxial (spindle) SC 4-31, a uma temperatura de 25°C.

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (BRASIL, 2007). Cerca de 10g de amostra foram analisados no dispositivo de amostras e o sensor imerso possibilitou, sob velocidades crescentes, a leitura das viscosidades. Foi traçada a curva correspondente a velocidades, a fim de serem classificados os sistemas em Newtonianos ou não-Newtonianos, isto é, que apresentam ou não viscosidades constantes sob qualquer condição (ISAAC *et al*, 2008).

O estudo do perfil reológico para viscosidade da emulsão foi realizado utilizando-se reômetro. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente

controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). As determinações foram realizadas com velocidades de rotação progressivamente mais altas e subseqüentemente diminuídas visando à obtenção das curvas ascendente e descendente, respectivamente. As velocidades de rotação são determinadas de acordo com a capacidade de leitura do aparelho e consistência da emulsão. Com valores de viscosidade aparente obtidos, são determinados os valores do índice de fluxo e de consistência de acordo com a Lei de Ostwald ou Lei das Potências (ALMEIDA, BAHIA, 2003).

#### 4.1.6.2 Densidade

A densidade foi determinada pelo método utilizando picnômetro, obtida com picnômetro de vidro de 25mL. Para a determinação da massa da amostra, o picnômetro foi completado com a amostra em estudo a  $25^\circ\text{C}$  e pesou-se em balança analítica. A densidade da amostra foi calculada pela razão entre a massa da amostra e o volume do picnômetro.

#### 4.1.6.3 Espalhabilidade

Esse teste baseia-se na resistência ao movimento forçado (extrusão).

Uma placa molde quadrada de vidro, com diâmetro de 20 cm e 0,2 mm de espessura, contendo um orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa de vidro de 20 X 20 cm. Sob essas placas posicionou-se uma folha de papel milimetrado e a amostra foi introduzida no orifício da placa molde, nivelando o óleo com uma espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de acrílico de peso 390,30g. Após um minuto calcula-se a superfície abrangida pelo óleo através da medição do diâmetro em duas posições opostas, para posterior cálculo do diâmetro médio (ZANIN *et al.*, 2001). Esta análise foi realizada em triplicata.



A espalhabilidade, determinada a 25°C é calculada pela equação representada abaixo:

$$Ei = \frac{d^2 \times \pi}{4}$$

Sendo:

*Ei* a espalhabilidade da amostra para o peso *i*, em  $mm^2$ , e *d* é o diâmetro médio, em milímetros.

#### 4.1.7 Métodos de avaliações biológicas das frações de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

##### 4.1.7.1 Avaliação da atividade antimicrobiana das frações de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A avaliação da atividade antimicrobiana da semente da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) segundo metodologia do CLSI (2009).

Apenas para esta análise microbiológica foi empregado o extrato bruto da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em sistema fechado a quente no aparelho soxhlet de acordo com item 4.1.4, utilizando como solvente o extrator álcool etílico absoluto (PA). Utilizou-se apenas extrato bruto como um pré-teste para avaliação da atividade microbiológica, caso este apresentasse resultado positivo, seria repetida a análise com as frações.

Foram inoculadas bactérias em meio de cultura caldo Mueller-Hinton, sendo a concentração de microrganismos ajustada em comparação com o tubo 0,5 da escala de McFarland, para padronização dos inóculos ( $10^8$  UFC/mL) dos microrganismos *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. Os extratos e frações foram dissolvidos em DMSO 2%. Foram utilizadas

concentrações decrescentes dos extratos, 5000 µg/mL, 2500 µg/mL, 1250 µg/mL, 625 µg/mL, 312 µg/mL, 156 µg/mL, 78 µg/mL, 39 µg/mL). Para o controle de esterilidade, utilizaram-se 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 100 µL de extrato na concentração de 10000 µg/mL. Para o controle negativo da atividade inibitória foi utilizado o diluente DMSO usado na preparação dos extratos. Para o controle positivo ou de viabilidade foram utilizados 100 µL de caldo Mueller-Hinton e 5 µL do inóculo bacteriano.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C por 16 a 20h. Decorrido esse intervalo de tempo foram acrescidos 20 µl de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazólio, Merck®) a 0,5% e as microplacas foram reincubadas por 3 h a 35 °C. Posteriormente, foi realizada a leitura dos resultados.

A presença de coloração vermelha nos orifícios é interpretada como prova negativa de efeito inibitório do extrato vegetal, enquanto que a ausência da coloração vermelha é considerada prova positiva da ação inibitória do extrato vegetal. Cada teste foi realizado em duplicata (CLSI, 2009; AYRES *et al.*, 2008).

#### 4.1.7.2 Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada por dois métodos. O primeiro baseia-se na formação de um complexo fosfomolibdênico e o segundo é caracterizado pela capacidade da amostra em reduzir o radical DPPH. Ambos utilizam leituras espectrofotométricas na região do UV para apresentar os resultados.

##### 4.1.7.2.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

Esse ensaio baseia-se na técnica descrita por Prieto, Pineda e Aguiar (1999). Possui capacidade de avaliar componentes lipofílicos e hidrofílicos (CANSIAN, 2010).

A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1M (28 mL), molibdato de amônio 0,03M (12 mL) e ácido sulfúrico 3M (20 mL), sendo o volume completado com água para 100 mL. Esse reativo é de preparo extemporâneo. Soluções padrões de vitamina C e rutina, bem como as frações a ser testada, devem estar na concentração de 200 µg/mL solubilizado de acordo com a solubilidade de cada amostra (BIANCO, 2003).

Em um tubo de ensaio, foi retirada uma alíquota de 0,1 mL da amostra, e adicionado 1 mL de reativo. O mesmo é feito para os padrões. Um branco é constituído de 0,1 mL de metanol e 1 mL de reativo. A análise foi realizada em triplicata, com os tubos hermeticamente fechados. Posteriormente, manteve-se a série de tubos em banho-maria a 95°C por 90 minutos. Após atingirem a temperatura ambiente, a leitura das absorbâncias (Abs) foi realizada em espectrofotômetro de UV da marca shimadzu, modelo UV 1601 PC, em 695 nm. Os resultados foram expressos em atividade antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação à vitamina C e rutina, conforme as equações abaixo:

#### AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C

$$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (amostra)}}{\text{Abs}_{(\text{VitaminaC})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

#### AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA

$$\frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (amostra)}}{\text{Abs}_{(\text{Rutina})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}} \times 100$$

#### 4.1.7.2.2 Redução do radical DPPH

Este é um método para análise da atividade antioxidante que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 515 nm<sup>10</sup>. Por ação de um antioxidante

ou uma espécie radicalar ( $R^\bullet$ ), o DPPH $^\bullet$  reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres.

Esse ensaio foi realizado de acordo com Mensor *et al.* (2001), a avaliação da capacidade antioxidante quantitativa tem como base a redução do radical DPPH medida em espectrofotometria de UV visível.

A solução de DPPH foi preparada minutos antes do ensaio a 0,03 mmol/mL em etanol absoluto. Foram preparadas cinco diluições de cada amostra, com concentrações que variam entre 100 µg/mL a 500 µg/mL. Em cada tubo de ensaio foi adicionado 2,5 mL de cada amostra diluída e 1 mL da solução de DPPH. As mesmas amostras diluídas (2,5 mL) com 1 mL de solvente (FM e FAC: metanol e FH e FC: hexano) sem reagir com DPPH constituem o branco da reação. E o controle corresponde a 2,5 mL de solvente com 1 mL de solução de DPPH. Estas são deixadas reagir em repouso por 30 minutos na temperatura ambiente.

Como padrões foram utilizados a vitamina C e a Rutina. Após os 30 minutos, foi medido a Abs das soluções em 518 nm. Todas as etapas foram feitas em triplicata. A porcentagem da atividade antioxidante (AA%) foi medida através da fórmula abaixo:

$$AA\% = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{\text{Abs controle positivo}}$$

Os valores da concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) foram calculados no Gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra da fração e a ordenada é a média da AA% das amostras de cada concentração. A equação da reta desse Gráfico, do tipo  $y = ax + b$ , serve de base para determinação do valor de  $IC_{50}$ .

#### 4.1.7.3 Ensaio *in vitro* da atividade da enzima Tirosinase

O ensaio da avaliação da atividade da enzima tirosinase foi executado de acordo com os métodos descritos previamente por Miyazawa e colaboradores (2003) com algumas modificações.

O método baseia-se na ação da enzima tirosinase sobre a L-tirosina fazendo uma hidroxilação e produzindo L-DOPA que, por conseguinte, sofre oxidação novamente por ação da tirosinase, produzindo dopaquinona (CANSIAN, 2010).

A atividade da tirosinase foi determinada com relação à formação de dopaquinona, metabólito colorido. Essa conversão enzimática pode ser mensurada por espectrometria UV-VIS, pois a dopaquinona absorve luz UV em 490 nm. Quanto maior a atividade da tirosinase, mais dopaquinona será formada e maior será a absorção no UV em comparação ao controle.

O efeito inibitório da atividade da tirosinase foi calculado em função da taxa de absorbância *versus* poço controle sem o composto ativo.

Este método consiste em testar a amostra em várias concentrações (100 - 300 – 1000 µg/mL) frente à enzima tirosinase (500 U/mL), em microplaca de 96 poços.

Adicionou-se a cada poço 170 µL L-tirosina 1mM ou L-DOPA 1mM, tampão fosfato de potássio 50mM (pH = 6,5), H<sub>2</sub>O (10:10:9). Foi incubada a microplaca a 37°C por 30 minutos.

Como controle positivo foi usado ácido kójico 1mM e controle negativo água destilada (VIRADOR *et al.*, 1999; LIM *et al.*, 2009).

Para a avaliação dos resultados utilizou-se o teste estatístico ANOVA de análise de variância entre grupos, seguidos por teste de Newman-Kewls.

Valores de  $p = 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos e foram representados nos Gráficos dos resultados da seguinte forma:  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*), de acordo com o nível de significância.

#### 4.1.7.4 Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

A realização de bioensaios para determinações de citotoxicidade como ensaio complementar a estudos fitoquímicos é muito importante, dentre os mais utilizados, é a toxicidade frente *Artemia salina* que é um microcrustáceo de água salgada usada como alimento para peixes. Este bioensaio é eficiente, apresenta facilidade no manuseio, rapidez dos ensaios, pequena quantidade de amostra e baixo custo, isto favorece sua utilização na rotina do laboratório e na seleção e monitoramento das pesquisas de plantas na procura de substâncias ativas (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Procedeu-se o preparo do ensaio conforme metodologia citada por Meyer *et al.* (1982).

##### 4.1.7.4.1 Preparo da solução salina

A água do mar artificial foi preparada adicionando 41 g de sal marinho (23 g NaCl; 11 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 4 g  $Na_2SO_4$ ; 1,3 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  ou  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ; 0,7 g KCl) em 1000 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 9,0 com  $Na_2CO_3$  para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação.

##### 4.1.7.4.2 Preparo das amostras

O estudo foi realizado com as frações FH, FC, FAC, FM. As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), foram pesados aproximadamente 20 mg e foi adicionado solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10 mg/mL (Figura 11). Os solventes utilizados foram escolhidos de acordo com a solubilização das amostras.

Desta solução foi transferida a amostra com pipeta automática para os tubos correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000  $\mu g/mL$ , em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (MCLAUGHLIN, CHANG, SMITH, 1991).

#### 4.1.7.4.3 Eclosão dos ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200 mg/400 mL) foram colocados para eclodir em água salgada por 48 horas, sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9 (UTYAMA, 2003).

#### 4.1.7.4.4 Avaliação da toxicidade

Após a eclosão dos ovos, foram transferidas 10 náuplios de *Artemia salina* para cada frasco contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, o qual foi evaporado juntamente com as amostras, além de tubos vazios. O controle positivo utilizado foi sulfato de quinidina. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5 mL.

Foi realizada a contagem dos náuplios mortos e vivos após 24 horas com iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos (FINNEY, 1956) e determinados os valores da concentração letal média (CL<sub>50</sub>) e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando CL<sub>50</sub> foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).



Figura 11 – Diluições das amostras com *Artemia salina*

Fonte: A autora, 2009

#### 4.1.7.5 Atividade hemolítica

Esta análise avalia a capacidade da substância estudada em realizar o rompimento das hemácias liberando hemoglobina no plasma.

O ensaio de atividade hemolítica foi realizado segundo a metodologia difusão em Ágar sangue na concentração de 1000 µg/mL, em duplicata. Como controle positivo foi utilizado padrão de saponina na mesma concentração e para controle negativo foi utilizado uma solução salina de 0,9%. As placas de ágar sangue de carneiro foram adquiridas da empresa NEWPROV.

Para o ensaio de difusão em ágar utilizou-se a técnica de antibiograma em discos, papéis Whatmann nº1 (7 mm de diâmetro, esterilizado) foram distribuídos sobre as placas de ágar sangue e em seguida impregnados com alíquotas de 20 µL das frações anteriormente preparadas. Como controle foi utilizado 20 µL dos respectivos solventes puros, aplicados aos discos. Após a aplicação, os meios foram incubados a 35 °C durante 24 horas. Decorrido este período, as placas foram inspecionadas quanto à presença de halos de hemólise (medidos em mm). A presença de saponinas pode gerar ação hemolítica (EFING, 2008).

#### 4.1.7.6 Bioensaios da atividade alelopática

A alelopatia é um mecanismo de interação química entre vegetais que desempenha um papel importante em diversos ecossistemas. É definida como o estudo de plantas que possuem a capacidade de auxiliar no controle de plantas invasoras, amenizando o uso de agrotóxicos. Estas plantas produzem substâncias químicas que podem influenciar outras, favorável ou desfavoravelmente no desenvolvimento de outros organismos, quando liberadas no ambiente (MAULI *et al.*, 2009).

O ensaio realizado foi preparado em placas de petri. Os efeitos alelopáticos das frações foram avaliados sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids), espécie amplamente citada na literatura por apresentar características apropriadas para os testes, pois são pequenas e possuem uma grande superfície de contato fazendo com que sejam bastante sensíveis ao meio que as rodeia



(DIAS *et al.*, 2005). Outros diferenciais é possuir germinação rápida, em aproximadamente 24h, crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos das soluções (RICE, 1984).

#### 4.1.7.6.1 Bioensaios de germinação e crescimento

Para o preparo das soluções as frações (FH, FM, FCL) foram pesadas em balança analítica, levando-se em consideração o teor de água. As soluções estoque (1000 mg/L) foram preparadas a partir da massa calculada para cada fração, as quais foram dissolvidas em DMSO (Dimetilsulfóxido) a 0,1% (DAYAN, ROMAGNI, DUKE, 2000), sendo as concentrações de 500 e 250 mg/L preparadas por diluição. As soluções foram tamponadas com solução de MES (Ácido 2-morfolinoetanosulfônico) 10 mM, e o pH foi ajustado para 6,0 (MACIAS, CASTELLANO, MOLINILLO, 2000) com solução de KOH 0,1 N, utilizando-se pHmetro. As frações foram ensaiadas com alface (*Lactuca sativa* L. cv. Grand rapids). Para os bioensaios de germinação, aplicou-se a metodologia de Macias, Castellano, Molinillo (2000). As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução dos tratamentos, preparadas nas concentrações de 250 mg/L, 500 mg/L e 1000 mg/L. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporos da espécie alvo, distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (1992). Como controle procedimento similar foi utilizado, porém com ausência das frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz (160 W), umidade relativa ( $\pm$  80%) e temperatura constante, conforme Brasil (1992) (alface, 25°C com luz interna constante). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, sendo realizadas a cada 12 horas, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes *et al.* (1987) e Macias, Castellano, Molinillo, (2000). Primeiramente as

sementes foram germinadas em placas de Petri contendo papel filtro umedecidas com 5,0 mL de água destilada. Após a germinação, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento, foram selecionadas 80 plântulas (quatro repetições de 20), para cada tratamento, e transferidas para placas de Petri contendo as soluções tratamento, utilizando-se procedimento similar ao descrito nos bioensaios de germinação. Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado. Posteriormente essas plântulas foram levadas para secar em uma estufa a 60°C até peso constante para a obtenção da massa seca.

#### 4.1.7.6.2 Análise do índice mitótico

Para determinação desse índice, foi empregada a metodologia descrita por Oliveira *et al.* (1996), com algumas modificações. Foram coletados de cada plântula dois centímetros da raiz primária, a partir da extremidade distal, e imersos em fixador de Farmer (3:1, etanol:ácido acético glacial) (JENSEN, 1962), durante 2 horas, a 25°C e, em seguida, foram transferidos para uma solução de álcool 70 % e armazenados a 8°C. Para determinação do índice mitótico, as pontas de raízes foram tratadas na seguinte ordem: 1) água destilada por cinco minutos; 2) ácido clorídrico 1M por 30 min à temperatura ambiente; 3) água destilada por cinco minutos e 4) azul de toluidina 2 % por 5 min. As pontas das raízes coradas tiveram o ápice, 2,0 mm iniciais, cortado sobre lâmina de microscópio, colocando-se em seguida a lamínula e pressionando sob esta o papel de filtro para esmagamento do ápice e retirada do excesso de corante. O material foi observado em microscópio ótico comum, com aumento de 1000X, contando-se o número de células em cada fase da mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase). Para cada tratamento foram preparadas três lâminas, avaliando-se três campos/lâmina. O índice mitótico foi obtido dividindo-se o número de células em mitose (prófase + metáfase + anáfase + telófase) pelo número total de células (interfase + mitose) multiplicando-se por 100.

#### 4.1.7.6.3 Análise enzimática

##### 4.1.7.6.3.1 Preparo do material vegetal para testes de atividade enzimática

Foram utilizados 2,0 g de material fresco maceradas em almofariz com nitrogênio líquido. O pó resultante foi homogeneizado com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, 50 mM, contendo EDTA 2 mM e ácido ascórbico 5 mM. O sobrenadante foi recolhido e utilizado como extrato bruto para as dosagens descritas a seguir, sendo o precipitado descartado (MARQUES, XAVIER FILHO, 1991). Os extratos foram acondicionados a -18°C no Laboratório de farmacotécnica da UFPR, até o momento da análise.

#### **a) Análise de Proteínas totais**

A quantificação foi feita pelo método descrito por Bradford (1976), pelo preparo do reagente em laboratório. A concentração de proteína dos extratos foi determinada por comparação com uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA), por espectrofotometria, a 594 nm de absorbância.

#### **b) Atividade da superóxido dismutase**

A atividade da superóxido dismutase foi determinada segundo método utilizado por Gupta *et al.* (1993), com modificações. A mistura de reação consistiu de fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 9,9 mM, azul de nitrotetrazolium 57 µM (NBT), riboflavina 44 mM, sendo retirados e 20 µL de sobrenadante para 1 mL de volume final. A riboflavina foi adicionada por último no tubo contendo o meio de reação. Os tubos de vidro foram expostos dentro de uma câmara com luz fluorescente de 15 Watts por 10 minutos a 10 centímetros da luz. No ensaio, uma unidade SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do azul de nitrotetrazolium. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e a atividade da SOD foi expressa em Unidade SOD . g-1 MF.

### **c) Análise da Atividade da peroxidase**

Foi determinada segundo Pütter (1974). O sistema de reação continha 0,96 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0), 20 µL de pirogallol 0,1 M como substrato e 20 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,1 M. Em seguida foi realizada a leitura da absorbância em 470 nm. A atividade específica (atividade peroxidásica/µg proteína) foi expressa em unidades de atividade enzimática (UAE), onde uma unidade corresponde, arbitrariamente, a uma diferença de 0,001 de absorbância/minuto/µg de proteína (GRAY *et al.*, 1996).

### **d) Análise da Atividade da catalase**

O ensaio para a determinação da catalase consistiu na adição de 60 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1M em uma mistura de reação contendo 3 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) e 100 µL do extrato enzimático. O decréscimo do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado pela absorbância a 240 nm, em intervalos de 10 segundos por um período de 1 minuto. A diferença de absorbância ( $\Delta A_{240}$  nm), obtida através de regressão linear, foi dividida pelo o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 39,4 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mim<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup> MF.

### **e) Análise da Atividade da ascorbato peroxidase**

A determinação da atividade da ascorbato peroxidase foi feita de acordo com Amako, Chen, Asada (1994). O meio de reação para APX continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio 1 mM, ácido ascórbico 0,5 mM, EDTA 0,1 mM e 100µL de sobrenadante do extrato. A taxa de oxidação do ascorbato foi estimada pelo monitoramento do decréscimo da absorbância a 290 nm, obtida em espectrofotômetro, e a atividade da APX foi expressa em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mim<sup>-1</sup>. g<sup>-1</sup>MF.

### **f) Análise da Atividade da polifenoloxidase**

A atividade de polifenoloxidase foi determinada de acordo com Duangmal, Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. O substrato utilizado foi composto por catecol 20 mM dissolvido em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8). Para a reação, que ocorreu a 30 °C, 900 µL do substrato foram

misturados com 100  $\mu$ L do extrato proteico. As leituras foram feitas a cada 10 s a 420 nm em espectrofotômetro, durante 1 min. O diferencial entre a terceira e a quinta leitura foi utilizado para a determinação da atividade. Os resultados foram expressos em unidades de PPO, sendo que uma unidade foi definida como um incremento de absorbância de 0,001 por min de reação por mg de proteína total.

#### **g) Análise da Atividade da $\alpha$ -amilase**

Para a determinação da alfa amilase, o extrato foi colocado em banho-maria a 70°C durante 20 minutos, adicionando-se 0,1 mL da amostra por tubo completando o volume de 1 mL com tampão e 1 mL de solução de amido, permanecendo incubado a 30°C por 5 minutos. Após, foi adicionado 1 mL de lugol e 9 mL de água, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 620 nm (ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, 1965). Os resultados foram expressos em  $\mu$ g de amido hidrolizado min<sup>-1</sup> g de sementes<sup>-1</sup>.

#### **h) Análise do Teor de clorofila e respiração**

Os teores de clorofila serão obtidos após a maceração das partes aéreas das plântulas em almofariz e extração com DMSO (CAYON *et al.*, 1990, com modificações). As absorbâncias das soluções foram lidas em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 645 e 663 nm e, a partir desses dados, foram calculados os teores de clorofila a, de clorofila b e de clorofila total (ARNON, 1949).

A respiração potencial das células radiculares das plântulas de alface foi estimada por meio da redução do cloridrato de trifênil tetrazólio (TTC) pela atividade de enzimas desidrogenase e do surgimento do formazan. Para a avaliação dessa característica as raízes foram cortadas a 1 cm a partir da coifa, sendo tomadas as suas massas e em seguida transferidas para tubos de ensaio de 17x120 mm, onde foram adicionados 3 mL de cloridrato de trifênil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) em tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Os tubos de ensaio foram mantidos sob vácuo em dissecadores, por 2 horas, sendo posteriormente transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 horas.

Ao final desse tempo, as soluções de TTC foram drenadas dos tubos de ensaio e as raízes lavadas uma vez em água destilada. Os tubos de ensaio contendo as raízes foram novamente transferidos para o banho-maria com água

fervente ( $\pm 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), sendo então adicionados 7 mL de etanol 95% (V/V). Decorridos 10 minutos, as soluções etanólicas obtidas foram drenadas para outros tubos de ensaio. Após o resfriamento à temperatura ambiente, cada solução foi acrescida de 10 mL de etanol 95% (V/V). As absorvâncias dessas soluções etanólicas foram lidas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 530 nm (STEPONKUS, LANPHEAR, 1967).

#### 4.1.7.6.4 Análise estatística

No presente trabalho o delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado envolvendo quatro ensaios simples, FH, FM e FCL de *C. sinensis*, com quatro tratamentos (0, 250, 500 e 1000 mg/L), em quatro repetições para os bioensaios de germinação e crescimento, e 3 repetições para os testes de índice mitótico e atividade enzimática. Cada parcela constituiu-se de 50 diásporos para germinação e dez para o crescimento da raiz e do hipocótilo. A germinabilidade (%G) foi calculada segundo a metodologia descrita por Labouriau (1983) e o índice de velocidade de germinação (IVG) segundo Maguire (1962) citado por Ferreira, Borghetti (2004).

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, ( $p < 0,05$ ), em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

## 4.2 SEGUNDA FASE: APLICAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DA SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck EM EMULSÕES AO MICROENCAPSULAMENTO DO ÓLEO DE SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

### 4.2.1 Desenvolvimento da formulação cosmética

Optou-se pelo desenvolvimento de três emulsões acrescidas 2% de óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck , sendo esta concentração usual no mercado cosmético, onde duas formulações foram formuladas em processo a frio, utilizando em sua formulação o tensoativo RM 2051<sup>®</sup>(INCI Quadro 1) e em outra o Hostacerin SAF<sup>®</sup> (INCI Quadro 1) e uma formulação com processo a quente, onde o tensoativo foi o Olivem 1000<sup>®</sup>. Estas foram preparadas em agitador a 600 rpm durante 30 minutos

Foram realizados testes de identificação da emulsão, estabilidade preliminar e acelerada e também análises sensoriais e de irritabilidade.

Esta fase da pesquisa teve como objetivo avaliar diferentes emulsionantes para aplicação do óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e não avaliação da atividade do óleo. Desta forma, utilizou-se matérias primas em associação para melhor estabilidade, sensorial, facilidade no preparo e menor gasto energético.

#### 4.2.1.1 Matérias-primas para preparação das emulsões

As matérias primas a seguir no Quadro 1, estão descritas, de acordo INCI - International Nomenclature of Cosmetic Ingredient e quando necessário, nome comercial, fabricante ou fornecedor.

Quadro 1 – Matérias primas utilizadas nas formulações cosméticas

<b>Matéria Prima (INCI)</b>	<b>Nome Comercial</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Atividade</b>
Água deionizada	-	-	Veículo, solvente
Glicerol (glycerin)	-	Chemspeccs	Umectante
Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben	Phenonip®	Clariant	Conservante
BHT (butyl-hidroxi-tolueno)	Prevint®	Chempeccs	Antioxidante
Cetyl Alcohol	Álcool Cetílico	Volp	Emulsionante e espessante
Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer	Carbopol ultrez 21®	Dinaco	Carbomero
Triethanolamine (TEA)	-	Volp	Alcalinizante
Sodium Polyacrylate (and) Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG/PPG-18/18 Dimethicone	RM 2051®	Dow Corning	Agente espessante e emulsionante
Mineral oil and Isopropyl Palmitate and Trilaureth-4 Phosphat and Rapeseed oil Sorbitol ester and Ammonium Acryloyldimethyltaurate / VP copolymer	Hostacerin SAF®	Clariant	Associação entre doadores de viscosidade, emulsionante e emolientes
Cetearyl olivate, Sorbitan Olivatate	Olivem 1000®	B&T company	Emulsionante
EDTA-Na	-	Volp	Sequestrante

Fonte: <http://ec.europa.eu/enterprise/cosmetics/cosing/>

O Hostacerin SAF® (INCI: Mineral oil and Isopropyl Palmitate and Trilaureth-4 Phosphat and Rapeseed oil Sorbitol Ester and Ammonium Acryloyldimethyltaurate / VP copolymer), é uma associação entre doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes para a preparação de emulsões a frio, permitindo maior facilidade no preparo das emulsões e redução do número de itens de matérias primas. Permite a formulação de emulsões O/A (óleo/água) estáveis. Possui caráter aniônico e é compatível com diversos aditivos como emolientes oleosos, extratos vegetais. No Quadro 2 segue as especificações conforme Informativo técnico- Clariant.

Quadro 2 – Dados físico-químicos do Hostacerin SAF®

Aspecto	líquido viscoso, amarelado
Matéria Ativa	~ 98 %
pH (Solução 1%)	~ 6,0

Fonte: Informativo técnico- Clariant



O RM 2051<sup>®</sup> (INCI: Sodium Polyacrylate (and) Dimethicone (and) Cyclopentasiloxane (and) trideceth-6 (and) PEG/PPG-18/18 Dimethicone, é uma emulsão invertida (A/O) de poliacrilato de sódio em dimeticone. Essa emulsão também contém dois surfactantes, um emulsificante de silicone (PEG/PPG-18/18 Dimeticone) para estabilizar RM 2051<sup>®</sup> e um agente inversor (Tridecete-6) que ajuda a fazer o polímero entrar em contato com a fase aquosa da formulação. Quando o produto é adicionado à água, o polímero expande-se instantaneamente na fase aquosa para espessar e dar estabilidade à preparação. Na medida em que a formulação espessa, as matérias primas da fase oleosa são emulsificadas e estabilizadas. Segue no Quadro 3 as especificações Informativo técnico – Dow Corning.

Quadro 3 – Especificações da matéria prima RM 2051<sup>®</sup> proveniente do informe técnico fornecido pela Dow Corning

Parâmetro	Unidade	Valor
Aparência	-	Líquido viscoso e opaco, levemente amarelado
Odor	-	Odor característico
Conteúdo em silicone	%	~29
Poliacrilato de sódio	%	~26
Viscosidade a 25°C/77°F (Brookfield LVT, 30rpm)	cPs	<4000
Ponto de fulgor	°C °F	>100 >212
Conteúdo de ciclotetrasiloxano (D4)	%	<1

Fonte: informe técnico Dow Corning

O Olivem 1000<sup>®</sup> é derivado do óleo de oliva, e um auto-emulsionante não iônico, um sistema funcional da nova geração, formando uma rede de cristal líquido no interior da emulsão, e permitindo a formulação de emulsões estáveis. Este auto-emulsionante é compatível com uma ampla variedade de ativos e ingredientes para cosméticos e também pode ser usada sobre uma ampla faixa de pH (3-12). É uma complexa combinação de ácidos graxos, quimicamente semelhante à composição lipídica da superfície da pele que tem a propriedade única de auto-emulsionar em ambientes hidrofílicos ou lipofílicos. E livre de sabões e não é etoxilado. Este

emulsionante oferece alta afinidade com a pele, pois sua composição é similar à dos ácidos graxos nela encontrados, como o oléico, o linoleico e o linolênico (<http://www.olivem1000.com/>).

#### 4.2.1.2 Formulações desenvolvidas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

As emulsões foram desenvolvidas tendo como fase oleosa os agentes emulsionantes, BHT e o óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. E como fase aquosa: água, EDTA-Na, Glicerina, carbômero, trietanolamina, Phenonip<sup>®</sup> (fenoxietanol e parabenos).

#### 4.2.1.3 Obtenção das emulsões

A fabricação das emulsões consistiu no processo de sobreposição de fases com velocidade controlada.

##### 4.2.1.3.1 Emulsão preparada em processo a quente

A emulsão foi preparada aquecendo a fase aquosa e oleosa separadamente à temperatura de  $75 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, a fase oleosa foi vertida lentamente sobre a aquosa sob agitação constante de 600 rpm, o auxílio de um agitador mecânico até a emulsão atingir a temperatura ambiente controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

#### 4.2.1.3.2 Emulsão preparada em processo a frio

A fase oleosa foi adicionada e homogeneizada ao tensoativo. A fase aquosa foi adicionada lentamente sobre a oleosa com agitação. A velocidade do agitador foi aumentada na medida em que a formulação foi ficando espessa, para que a capacidade de mistura se mantivesse. A agitação se manteve 600 rpm por 30 minutos.

#### 4.2.2 Caracterização da formulação desenvolvida

##### 4.2.2.1 Análise macroscópica e organoléptica

A análise macroscópica foi realizada vinte e quatro horas após o preparo das amostras (estabilidade intrínseca) de acordo com Roland *et al.* (2003). Esta análise tem como objetivo verificar características organolépticas e a homogeneidade das formulações com a finalidade de identificar a instabilidade visível (presença de sedimentação, coalescência, alterações de cor, odor, viscosidade, formação de grumos). As emulsões macroscopicamente estáveis foram submetidas à análise microscópica e testes preliminares de estabilidade.

##### **a. Aspecto**

A amostra foi analisada a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, de precipitação é indicativa de estabilidade da amostra ensaiada (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

##### **b. Cor**

A colorimetria é realizada pela comparação visual, sob condições de luz branca. A amostra foi classificada, em relação à cor em: normal, sem alteração;

levemente modificada; modificada; intensamente modificada (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

### **c. Odor**

O odor da amostra foi ensaiada diretamente através do olfato. A amostra foi classificada, em relação ao odor em: normal, sem alteração; levemente modificado; modificado; intensamente modificado (BRASIL, 2004).

#### **4.2.2.2 Avaliação de homogeneidade por microscopia**

Após 24H do preparo das emulsões, pequena quantidade (0,1g) das amostras foram diluídas em água destilada (1 gota) e, colocadas em lâmina de vidro sob prensa de lamínula e submetidas à análise microscópica com microscópio comum em aumento de 40x visando observar características da formulação, como a formação de glóbulos e homogeneidade da emulsão (FERRARI, 2002; AZZINI, 1999; FERRARI, 1998). Foi utilizado corante para melhor visualização do tamanho e aspecto dos glóbulos individualizados.

#### **4.2.2.3 Determinação do tipo de emulsão**

Para avaliação do tipo de emulsão (A/O ou O/A) foi realizado o teste de diluição que consiste na determinação da solubilidade da fase externa da emulsão em dois solventes, água ou óleo mineral (PRISTA, ALVES, MORGADO, 1996). Foram adicionados 3,0 g da emulsão em um tubo de ensaio contendo 7,0 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e o aspecto avaliado (MASSARO *et al.*, 2003). Foi utilizado o seguinte critério para classificação do tipo de emulsão: Emulsão O/A = quando a mistura apresentar aspecto homogêneo; Emulsão A/O = quando a mistura apresentar aspecto não homogêneo, com aparência de mistura coagulada. Para confirmar os resultados foi elaborada uma contra prova

adicionando-se 3,0 g da emulsão a 7,0 mL de óleo mineral e realizado o mesmo protocolo, porém com critérios de classificação opostos (ANDRADE, 2008).

#### 4.2.2.4 Teste de espalhabilidade *in vitro* das emulsões formuladas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

A determinação da espalhabilidade da amostra foi realizada de acordo com o método proposto para realização da espalhabilidade do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. O teste foi realizado a partir da leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra em um sistema formado por uma placa molde de peso 390,30g, quadrada de vidro com orifício central, sobre uma placa suporte de vidro posicionado sobre uma escala milimetrada. A amostra foi colocada entre duas placas de vidro, sendo uma delas disposta sobre um papel milimetrado, a temperatura ambiente (ZANIN *et al.*, 2001). O teste foi realizado em duplicata e aplicando a equação:  $E_i \text{ (mm}^2\text{)} = D^2 \text{ (mm)} \pi / 4$ , determinou-se a espalhabilidade de cada emulsão formulada com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck .

#### 4.2.2.5 Medida do pH das emulsões

Após 24 horas da manipulação das formulações, foram realizadas através de um pHmêtro digital com um eletrodo de vidro que introduzido no interior da emulsão acusou o valor exato do pH; à temperatura de  $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  (BRASIL, 2004). O aparelho foi previamente calibrado com soluções tampão a pH 4,7 e 10. Os valores do pH das emulsões foram mantidos entre 5,5 e 6,7, compatíveis com o pH cutâneo.

#### 4.2.2.6 Determinação da densidade

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Quando a água é utilizada como substância padrão, a densidade determinada é a densidade específica (BRASIL, 2007). A determinação da densidade específica deve ser realizada em picnômetro, acoplado com termômetro, previamente pesado vazio. A amostra deve ser inserida no picnômetro e a temperatura deve ser ajustada para 20°C, quando, então, o picnômetro deve ser pesado. A diferença entre a massa do picnômetro com a amostra e do picnômetro vazio é a massa da amostra. A relação entre a massa da amostra e a massa da água, ambas a 20°C representa a densidade específica da amostra ensaiada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2001).

#### 4.2.2.7 Determinação da viscosidade da emulsão formulada

A viscosidade depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (BRASIL, 2007). Cerca de 30g de amostra foram analisados no viscosímetro Brookfield viscometer modelo RVT, utilizando spindle 6 e 7. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente controlada ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ). As velocidades de rotação foram determinadas de acordo com a capacidade de leitura do aparelho e consistência da emulsão (ALMEIDA, BAHIA, 2003).

#### 4.2.3 Testes preliminares de estabilidade das emulsões

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis após vinte e quatro horas de sua manipulação foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade (FERRARI, 2002; AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

O teste de estabilidade preliminar consiste em submeter à amostra a condições extremas de temperatura e realizar os ensaios em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

Para os testes preliminares foram empregados a seguinte nomenclatura para qualificá-los: N = Normal, sem alteração; LM = Levemente Modificada (apresentava-se com tendência em separar-se demonstrada pela visualização de uma tênue linha divisória); M = Modificada (quando ocorria acentuação dessa linha divisória, com separação de fases total) (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998).

Os testes realizados foram o teste de estabilidade a força centrífuga e Testes de estabilidade a variação de temperatura pelo ciclo gelo-degelo e estresse térmico.

#### 4.2.3.1 Testes de centrifugação

Em tubo de ensaio para centrífuga, cônico, graduado, de 10 g de capacidade, foram pesados, em balança semi-analítica, cerca de 5 g de cada amostra foram submetidos, na centrífuga a 3000 rpm durante 30 minutos, em temperatura ambiente controlada ( $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ). O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação. A não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade (BRASIL, 2004).

#### 4.2.3.2 Estresse térmico

Amostras de 5,0g das formulações foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho termostatzado na faixa de

temperatura de  $40\pm 2^{\circ}\text{C}$  a  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A cada 30 minutos a temperatura foi elevada em  $5^{\circ}\text{C}$ . A cada aumento de temperatura e ao término de  $80\pm 2^{\circ}\text{C}$  as formulações foram macroscopicamente avaliadas (BRACONI *et al.*, 1995). A não ocorrência de separação de fases é indicativa de estabilidade do produto ensaiado (ISAAC *et al.*, 2008).

#### 4.2.4 Teste de estabilidade acelerada das emulsões

##### 4.2.4.1 Ciclo gela degela

Cerca de 10 g da amostra foram submetidos a condições extremas de temperaturas, nos chamados ciclos. Foram realizados ciclos gela/degela a fim de avaliar a estabilidade das amostras frente a mudanças bruscas de temperatura. Este ensaio consiste em submeter às amostras à temperatura de  $45\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas e após  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, completando assim um ciclo. As leituras foram realizadas antes do início do teste (24 horas após o preparo) e no final do 6º ciclo (12º dia) (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

As amostras foram avaliadas macroscopicamente a cada mudança de temperatura durante a realização do teste (FERRARI, 2002; AZZINI, 1999; FERRARI, 1998). Os parâmetros analisados para cada amostra foram: aspecto, cor, odor (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

As formulações foram preparadas 24 horas antes da primeira análise e acondicionadas em potes de vidro com capacidade para 50g, sendo então armazenadas no ambiente e em estufas termostatizadas  $45^{\circ}\text{C}$  e luz ultravioleta (UV) por um período de 90 dias. Em intervalos determinados foram retiradas amostras das formulações que permaneceram por 24 horas em temperatura ambiente, para após realizar as análises.

O material empregado em ensaios de estabilidade foi produzido em um único lote, usando as mesmas matérias-primas, para não haver possibilidade de interferência na estabilidade do sistema, caso as matérias primas fossem de diversos fornecedores e apresentassem prazos de validade diferentes.



Este teste tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil. Emprega condições não extremas e serve como auxiliar na determinação da estabilidade da formulação. É importante que a quantidade de produto seja suficiente para as avaliações necessárias e que o volume total da embalagem não seja completado, sendo respeitado um terço da capacidade da embalagem para possíveis trocas gasosas (BRASIL, 2004).

As amostras que foram consideradas estáveis pelos testes preliminares, foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada. Foram acondicionadas 50g em frasco de vidro transparente hermeticamente fechados, e submetidas à temperaturas ambiente ( $25 \pm 3$  °C),  $45 \pm 2$ °C e luz ultravioleta (UV), por 90 dias, sendo as análises realizadas nos tempos 24 horas e aos 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dia de permanência em cada condição. As amostras foram submetidas a aquecimento em estufas, exposição à radiação luminosa e ao ambiente, com controle da temperatura e analisadas em relação aos vários parâmetros de acordo com a forma cosmética estudada (ISAAC *et al.*, 2008; BRASIL, 2004).

O 1° dia do teste, nesta metodologia, corresponde a vinte e quatro horas após o preparo das formulações.

Os testes utilizados para avaliação da estabilidade foram: macroscopia, viscosidade, densidade e pH.

#### 4.2.5 Avaliação sensorial das emulsões formuladas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Após a devida aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (Anexo A), foram selecionadas 20 voluntárias para a avaliação dos efeitos imediatos das formulações.

A análise sensorial foi realizada no laboratório de farmacotécnica sob condições climáticas adequadas. Os testes foram realizados a partir de 20 minutos de aclimação em ambiente com controle de temperatura (19-21°C) e de umidade relativa do ar (40-50%) (CAMARGO JUNIOR, 2006). As voluntárias apresentaram

idades entre 20 e 35 anos (peles sensíveis branca clara ou negras não foram utilizadas no estudo), não possuíam hábito de fumar, não apresentavam alterações hormonais significativas como menopausa, hiper ou hipotireoidismo, entre outros e não apresentavam nenhum tipo de alergia ou dermatose nas regiões dos antebraços (CAMARGO JUNIOR, 2006). Antes do início da aplicação as voluntárias foram orientadas pela pesquisadora. As voluntárias leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declarando que estavam plenamente de acordo em participar da pesquisa, estando cientes dos procedimentos, dos riscos e dos benefícios.

As emulsões foram pesadas em papel manteiga e aplicadas diretamente na pele pelas voluntárias, massageando o local com movimentos suaves e circulares até não permanecer resíduos na pele. O antebraço foi dividido em três regiões onde as formulações teste foram aplicadas aleatoriamente, variando-se entre as regiões de aplicação entre as voluntárias.

As voluntárias aplicaram uma quantidade padronizada (200mg) das formulações 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em regiões distintas na porção inferior média dos antebraços, e em seguida receberam um questionário de avaliação sensorial (conforme Anexo B), no qual constavam questões relacionadas a toque e pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele, sensação imediata e sensação após 5 minutos da aplicação (CAMARGO JUNIOR, 2006).

Os resultados foram interpretados atribuindo notas de 1 a 5 para cada item avaliado, desde desgostei muito até gostei muito. Esta análise tem como objetivo avaliar a aceitação e preferência dos consumidores, para fins de levantamento comercial.

#### 4.2.6 Ensaio de irritação em modelo organotípico HET-CAM utilizando a formulação escolhida

Foram utilizados ovos fecundados de 10 dias.

#### 4.2.6.1 Ensaio de irritação em modelo organotípico – HET-CAM

A membrana corioalantóide (CAM) do ovo de galinha é uma estrutura muito vascularizada, utilizada pelo embrião do frango para as trocas gasosas através da casca de ovo. Suas características estruturais fazem com que sejam considerados similares a tecidos altamente vascularizados como a conjuntiva, sendo capaz de responder frente a produtos irritantes. O método utilizado corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke (1985), aceito pela legislação francesa e indicado pela ANVISA, na avaliação da segurança de diferentes tipos de produtos cosméticos e farmacêuticos (VINARDELL, MITJANS 2006; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL, GARCÍA, 2000). É um método estimativo de irritação de mucosas, principalmente ocular.

#### 4.2.6.2 Preparação da membrana corioalantóide

De acordo com a Figura 12 os ovos foram cuidadosamente colocados em posição vertical sobre um suporte para ovos, de forma que a parte mais larga e plana fique voltada para cima. Com o auxílio de tesouras planas foi realizado um pequeno furo no centro da parte superior da casca, a qual foi recortada circularmente com tesouras curvas, e posteriormente foi retirada a primeira membrana de aspecto esbranquiçado para deixar descoberta a membrana corioalantóide. Esta membrana foi caracterizada por sua transparência e pela presença de vasos sanguíneos evidentes. A seguir, as membranas foram avaliadas com finalidade de verificar danos, o que causaria a rejeição do ovo no experimento. Também foram descartados os ovos em que não haja embrião ou em caso de morte (ausência de respiração e mobilidade) (VINARDELL, MITJANS, 2006; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL, GARCÍA, 2000).



Figura 12 – Etapas do Teste HET-CAM

Fonte: [http://www.schrader-institute.de/html/creachem\\_tox\\_ver.htm](http://www.schrader-institute.de/html/creachem_tox_ver.htm)

#### 4.2.6.3 Aplicação da amostra

No caso de amostras líquidas foram aplicados 0,3 mL com auxílio de uma micropipeta diretamente sobre a membrana corioalantóide. Para as amostras cremosas foram pesados 0,3 g, são depositados previamente em um pedaço de parafilm, para favorecer posteriormente a retirada do produto, e aplicada sobre a membrana. Os produtos permanecem em contato com a membrana durante 20 segundos, após o período de contato, a membrana foi lavada para retirar o produto e realizada a avaliação da membrana corioalantóide. A emulsão foi aplicada diretamente às membranas sem diluições.

#### 4.2.6.4 Controles positivos

Como controles positivos, os ovos foram tratados com NaOH (0,1 N) como modelo de produtos altamente irritantes e nos quais se observam sempre os três parâmetros a serem considerados (hiperemia, hemorragia e coagulação).

#### 4.2.6.5 Observação da membrana

Após a aplicação do produto, a membrana foi observada durante 5 minutos e foi anotado o momento (tempo em segundos) em que ocorreu o aparecimento dos sintomas de irritação, ou seja, hiperemia, hemorragia e/ou coagulação. Foram avaliados os seguintes critérios: hiperemia: se observa o aparecimento de capilares que antes não eram visíveis ou os que já eram visíveis se observam mais vermelhos e intensos. Hemorragia: foi anotado o tempo necessário para a ocorrência da hemorragia, a qual foi observada por uma clara difusão de sangue no meio. Coagulação: é detectada pela agregação de plaquetas que forma uma espécie de mancha rosada ou a coagulação de proteínas dando um aspecto de grumos esbranquiçados. Foi possível também observar um fenômeno de opacidade total ou parcial da membrana (VINARDELL, MITJANS, 2006; MURILLO *et al.*, 2003; VINARDELL, GARCÍA, 2000).

#### 4.2.6.6 Avaliação das lesões

Foi dada uma pontuação em função do tempo (T) de aparição das diferentes lesões, segundo descrito na Tabela 1. Foram utilizados quatro ovos para avaliar cada produto, sendo que as pontuações de cada fenômeno, observada para cada ovo, foram utilizadas para o cálculo da média aritmética. A partir deste valor foi determinada a categoria em que se encaixa o produto segundo a classificação indicada na Tabela 2

Tabela 1 – Pontuação referente ao aparecimento dos fenômenos em função do tempo

Reação	Tempo		
	$T \leq 30s$	$30s \geq T \leq 2min$	$2min \geq T \leq 5min$
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: PEREIRA, 2008

Tabela 2 – Classificação dos produtos de acordo com a pontuação dos fenômenos

Índice HET-CAM	Categorias
$N < 1$	Praticamente não irritante
$1 \leq N \leq 5$	Ligeiramente irritante
$5 \leq N \leq 9$	Moderadamente irritante
$N \geq 9$	Irritante

Fonte: PEREIRA, 2008

#### 4.2.7 Obtenção das microcápsulas

As microcápsulas de alginato de sódio foram obtidas por gelificação iônica. O alginato de sódio possui a capacidade de formar géis insolúveis na água por ligação cruzada com cátions divalentes como o  $Ca^{+2}$ .

Foram preparadas formulações de alginato de sódio 0,5%, dispersas em 3,33% de óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e 0,001% de corante lipofílico vermelho, dispersas por 1 minuto em agitador a 2.000 rpm. Em uma das formulações acrescentou-se 1% do tensoativo Polisorbato 80 e dispersou-se por mais 1min. Estas formulações foram mantidas a  $60 \pm 5^{\circ}C$  sob agitação contínua e gotejadas sobre uma solução de  $CaCl_2$  a 1% utilizando uma seringa com agulha 3 x 0,4 mm. As microcápsulas foram mantidas sob agitação por 30 minutos. Posteriormente foram lavadas com água, colocadas em banho de quitosana 0,25% de pH 4,8 por 12 horas para reticulação das microcápsulas.

As microcápsulas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de 10 vezes, munido de câmara fotográfica.

As formulações das microcápsulas estão apresentadas no Quadro 4.

Quadro 4 – Formulações das microcápsulas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

<b>Componentes</b>	<b>Fórmula com tensoativo</b>	<b>Fórmula isenta de tensoativo</b>
Alginato de sódio (segundo USP)	0,5%	0,5%
CaCl <sub>2</sub>	1,0%	1,0%
Quitosana	0,25%	0,25%
Corante	0,001%	0,001%
óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	3,33%	3,33%
Polisorbato 80 (tensoativo)	1,0%	-

Fonte: A autora

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Foram obtidos manualmente 130,99 gramas de sementes fragmentadas de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck secas a 40°C por 19 horas em estufa.

### 5.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

A média do teor de umidade encontrada da amostra foi de 3,42%. O teor de umidade é importante para o conhecimento básico, podendo ser utilizado como parâmetro para o controle de qualidade de amostras, possibilitando a segurança para análises posteriores, na preparação de extratos, rendimento e identificação dos constituintes das sementes.

### 5.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

O conteúdo de cinzas totais estabelece a qualidade de substância residual não volátil no processo de incineração (CÍRIO *et al.*, 2003). Os dados obtidos na análise de cinzas totais contribuem significativamente no controle de qualidade e padronização das sementes. As análises foram realizadas em triplicata, a média e coeficiente de variação encontra-se na Tabela 3 e está próximo aos resultados citados por El-Adawy *et al.* (1999) e Habib *et al.* (1986) que relataram o conteúdo de cinzas sementes de *Citrus* egípcio de, 3,1-3,4% e 2,2-3,5%, respectivamente.

Tabela 3 – Resultado cinzas totais das sementes

Média	Coeficiente de variação
2,76%	3,17



#### 5.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES CLOROFÓRMIO, METANOL, HEXANO E ACETATO DE ETILA

A extração com solventes orgânicos em extrator de Soxhlet (Figura 13) é considerado um processo eficiente e bastante utilizado. Com o extrator Soxhlet, utiliza-se um volume pequeno de solvente, que fica sob aquecimento e a todo o momento em contato com a amostra promovendo uma maior interação entre sólido-líquido (PAIVA *et al.*, 2004).

Iniciou-se a extração com 130,99g de material. As extrações ocorreram em um período de 6 horas. Foram obtidas as frações metanol (FM), acetato de etila (FAC), clorofórmica (FCL ou FC) e hexânica (FH ou óleo). As frações foram evaporadas em banho-maria em temperatura não excedente a 40°C, a fim de evitar decomposição de substâncias termo-sensíveis. Os rendimentos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento das frações das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa
Fração Hexânica (óleo da semente)	52,36	39,97
Fração Clorofórmica	3,24	2,48
Fração Acetato de etila	0,67	0,51
Fração Metanol	3,22	2,46



Figura 13 – Extração das frações  
Fonte: A autora , 2009

Na presente pesquisa o rendimento do Óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck brasileira foi de 39,97%. Para Anwar *et al.* (2008) a porcentagem de rendimento médio de óleo de *Citrus*: *Citrus limetta* (Mitha), *C. paradisi* (Grapefruit), *C. sinensis* (Mussami) e *C. reticulata* (Kinnow) de 27,0-36,5%. Saleem *et al.* (1977) relataram o rendimento de óleo das sementes de *Citrus* (*C. sinensis*, *C. reticulata*, *C. paradisi*) foram 32,4-36,4%. Habib *et al.* (1986) analisaram as sementes das frutas cítricas laranja, tangerina, limão e toranja. Os óleos foram extraídos com éter de petróleo e foi obtido um rendimento superior a 40%. Trandjiiska e Nguyen (1989) estudaram *Citrus* do Vietnã, cujo rendimento de óleo de semente foi de 55-60% (laranja), 60-65% (toranja), 48-50% (tangerina) e 40-46% (limão). No trabalho de Ajewole e Adeyeye (1993) o rendimento do óleo de sementes de *Citrus*, foi relatado o rendimento entre 24,3 e 41,1%. Estudos de Fernandes *et al.*, (2002), no qual foi extraído o óleo da semente de frutas cítricas do Brasil, com solvente hexano, através

do aparelho soxhlet obteve-se um rendimento de 24,27% (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck ), 24,62% (*C.limon*) e 28,35% (*C. reticulata*). As extrações realizadas apenas com *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e *C. reticulata* em condições de extração com fluido supercrítico de dióxido de carbono obteve rendimento de 37,00% e 26,5% respectivamente. El-Adawy *et al.* (1999) relataram o teor de lipídios das sementes de *Citrus* egípcios (Citron, Laranja, e Mandarin) variando de 38,9 a 42,6%. Sementes de variedades de frutas cítricas da Tunísia foram analisadas o rendimento, sendo que a semente de limão apresentou maior rendimento (78%), a laranja (51,8%) e a bergamota e laranja amarga (26%). Foi utilizado como solvente na extração o éter de petróleo (SAÏDANI, DHIFI, MARZOUK, 2004).

O conteúdo de óleo de sementes de *Citrus* determinada no presente análise a partir de semente de laranjas do Brasil foi encontrada valores bastante comparáveis com os citados acima, estando mais próximo do *Citrus* pesquisado por Habib *et al.* (1986) .

## 5.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Foram recolhidos 122 frascos com o sistema eluente da coluna cromatográfica da fração clorofórmio.

A partir do fracionamento da fração clorofórmio da semente da espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, foram isolados quatro compostos, sendo três obtidos das subfrações da coluna cromatográfica da fração clorofórmio (FC2), (FC3) e (FC4) e uma por cristalização direta na fração clorofórmio (FC1) que filtrada em funil sinterizado de sílica G3 a vácuo, forneceu 780 mg de cristais branco-amarelados, que correspondem a 0,60% de rendimento. As substâncias isoladas, foram denominadas de FC1, FC2, FC3 e FC4 e posteriormente encaminhadas para identificação. Até o presente momento FC4 foi identificada por RMN e IV e FC2 por CG.

Foram encontrados nas subfrações 7 a 11 um componente com aspecto oleoso de cor amarelo claro, que após CCD hexano: acetato de etila: ácido fórmico

(85:20:3) e revelador foi DPPH 0,2% em metanol, foram reunidos e identificado como (FC2).

Com objetivo de comparar as amostras, ambas de característica oleosa, entre a fração hexânica (FH) e FC2, foi realizado CCD (tolueno e acetato de etila (93:7) e revelador vanilina 5% ácido fosfórico 5% 1:1), observando-se que possuem  $R_f$  distintos e, portanto de características diferentes (Figura 14).



Figura 14 – CCD - comparação da FH e FC2

Fonte: A autora, 2010

Por meio da CCD foram reunidas as subfrações 68-82, nomeado como (FC3) que ainda serão identificadas, com 28,7 mg deste composto.

Por avaliação em CCD foram reunidas as subfrações 37-51. Estes cristais foram lavados com hexano para remoção de impurezas. Preparou-se uma nova CCD que foi possível visualizar a pureza da substância e enviado para identificação. O composto (FC4) apresentou-se como sólido amorfo branco e rendimento de 72,9 mg.

### 5.5.1 Identificação estrutural da substância FC4

No espectro de infravermelho (Figura 15) pode-se perceber que há uma banda larga de absorção em  $3456\text{ cm}^{-1}$  característico da hidroxila, muito provavelmente devido à presença de  $\text{H}_2\text{O}$  retida no retículo cristalino do sólido analisado, visto que as substâncias presentes na fração FC4 mesmo sendo altamente oxigenadas, não apresentam hidroxila livre. Em  $2930$  e  $2966\text{ cm}^{-1}$  há bandas características do estiramento das ligações C-H dos grupos alquílicos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ . As bandas em  $1707$  e  $1757\text{ cm}^{-1}$  são características do estiramento das ligações C-O dos grupos carbonila e carboxila (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRIL, 1994)

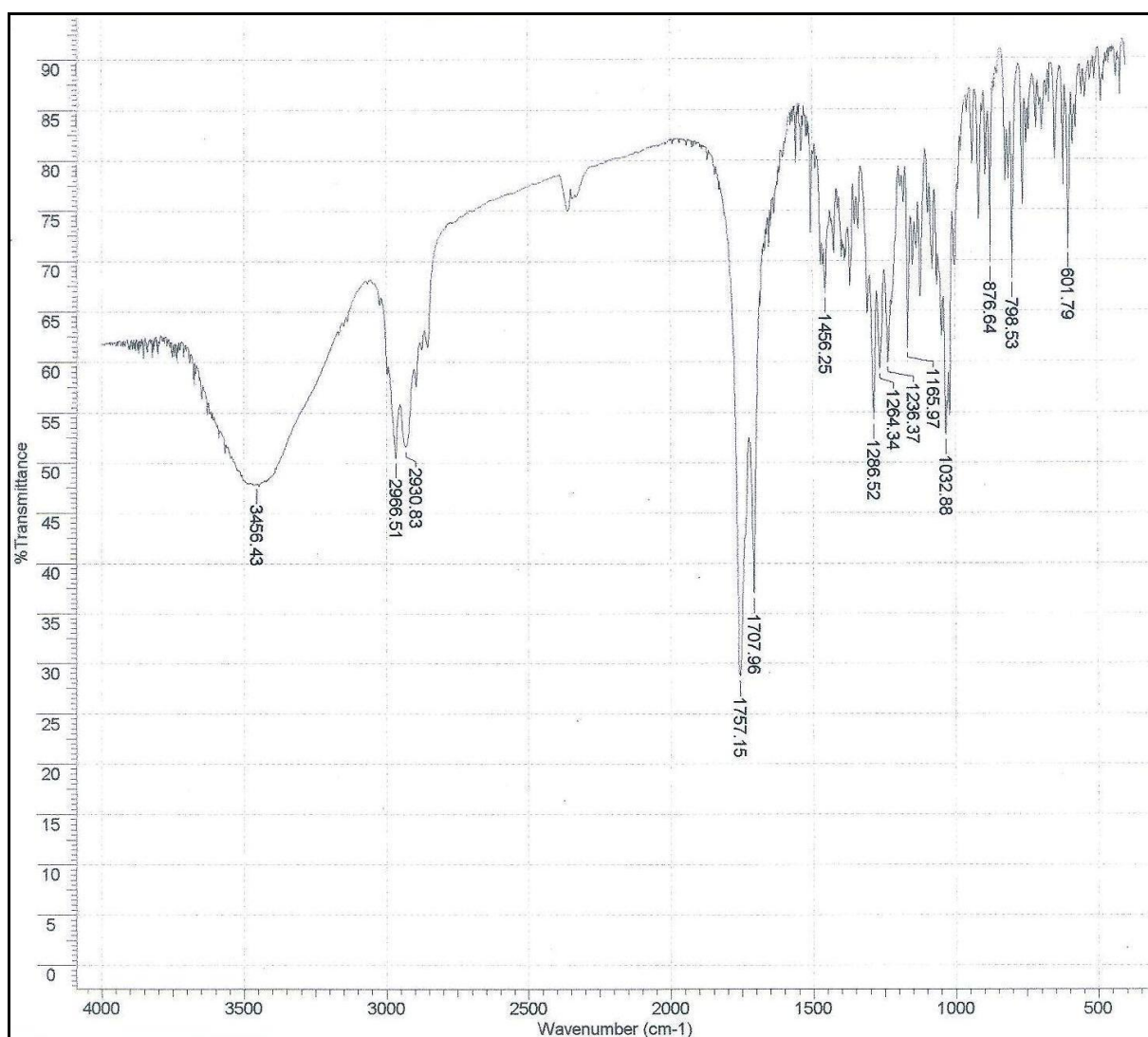


Figura 15 – Espectro de absorção no Infravermelho da substância FC4

De acordo com a figura 16 o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  para FC4, apresentou 52 sinais distribuídos na região de 17 a 208 ppm. Sua análise revelou que os sinais apresentavam intensidades diferentes, sendo possível de essa maneira separar os 52 sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em dois conjuntos de 26 sinais cada. Após uma análise detalhada de cada conjunto de sinais, foi possível constatar que a fração FC4 tratava-se de uma mistura (7:3) de dois limonóides. Por meio das intensidades dos deslocamentos foi possível identificar os dois limonóides presentes, pois a substância majoritária revelou uma intensidade maior em relação à segunda substância encontrada. Por meio de comparação com a literatura identificou-se o limonóide majoritário (FC4A, com 70% da mistura) como Limonina (Figura 19) e o minoritário (FC4B, com 30% da mistura) como Nomilina (Figura 20).

Em relação ao composto majoritário da mistura agora denominado de FC4A, por meio da análise de espectro DEPT  $135^\circ$  (Figura 18), foi possível constatar a presença de 4 carbonos metílicos ( $\delta_{\text{C}}$  17.4, 30.1, 20.0 e 21.8), 5 carbonos metilênicos ( $\delta_{\text{C}}$  36.0, 36.6, 17.9, 29.6 e 65.2), 7 carbonos metínicos e 10 carbonos quaternários, conforme ilustra a Figura 17. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 16) revelou a presença de sinais característicos do anel furano dos limonóides, os hidrogênios H-21 e H-23 apareceram como um singlete largo integrando para 2H em  $\delta_{\text{H}}$  7.66 e o sinal do hidrogênio H-22 apareceu também como singlete largo em  $\delta_{\text{H}}$  6.5, integrando para 1H. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  o anel furano pode ser constatado pelos sinais de carbono em  $\delta$  143.81 (C-21); 110,6 (C-22) e 142,1 (C-23). Desta forma, confirma-se o anel furano e atribui-se o sinal em 120,1 ao carbono C-20.

O sinal do hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  5,47 (s) foi atribuído ao H-17 do anel D – epoxilactona e através da integração de seu sinal foi possível quantificar a presença desse limóide na mistura. Um singlete em  $\delta_{\text{H}}$  4.1 sugere um epóxido entre C-14 e C-15.

A presença de sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,46 (dd,  $J = 12.9$  Hz) e  $\delta_{\text{H}}$  4,10 (d,  $J = 12,9$  Hz), atribuídos aos hidrogênios geminais do C-19, sugerem tratar-se de um limonóide com o anel A-seco, este fato pode ser confirmado através da presença de um carbono metilênico carbinólico em  $\delta_{\text{C}}$  65,2. O carbono em  $\delta_{\text{C}}$  170,0 observado no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  foi atribuído à presença de um grupo carboxila em C-3.

Os hidrogênios metilênicos H-12 foram observados em  $\delta_H$  1.26 (m) e  $\delta_H$  1,73 (m). Dois singletos (3H) relativo a grupos metílico foram observados em  $\delta_H$  1,02 (Me-26) e  $\delta_H$  1,18 (Me-25).

A posição do epóxido entre os carbonos 14 e 15 foi definida a partir das multiplicidades apresentadas para os carbonos 14 e 15 respectivamente. O carbono quaternário em  $\delta_c$  67,1 para C-14 e um carbono metínico em  $\delta_c$  54,1 para C-15, aliado a presença de um sinal em  $\delta_H$  4.10 (s) que foi atribuído ao H-15 do anel lactônico.

A estrutura da substância FC4A foi identificada então como sendo o limonóide limonina, característico do gênero *Citrus* (Rutaceae). Os dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  de FC4A estão listados na Tabela 5 juntamente com os dados descritos na literatura para a limonina.

Em relação ao composto minoritário da mistura denominado de FC4B, foi possível através da análise de espectro de DEPT 135° constatar a presença de 5 carbonos metílicos, e 4 metilênicos, 8 carbonos metínicos e 10 carbonos quaternários. A multiplicidade apresentada para os 26 carbonos de FC4B sugerem que o esqueleto desse limonóide não seja do tipo anel A-seco, como FC-4A, principalmente devido à ausência do sinal de um carbono metilênico carbinólico em torno de 65 ppm, e também pela ausência dos dois duplos dubletos atribuídos aos hidrogênios geminais do C-19 em torno de 4 ppm. Este limonóide apresenta 4 carbonos metilênicos e 5 metílicos, ou seja, a metila em C-19 não se encontra ciclizada com a carboxila em C-3 formando um anel adicional, como em FC4A.

A análise do espectro de RMN  $^1H$  (Figura 16) revelou também a presença de sinais característicos do anel furano dos limonóides, tais como os hidrogênios H-21 e H-23 que apareceram como um singleto largo integrando para 2H em  $\delta_H$  7.66, e o sinal do hidrogênio H-22 apareceu também como singleto largo em  $\delta_H$  6.49, integrando para 1H. No espectro de RMN de  $^{13}C$  o anel furano pode ser constatado pelos sinais de carbono em  $\delta$  143,8 (C-21); 110,5 (C-22) e 142,0 (C-23). Desta forma, confirma-se o anel furano e atribui-se o sinal em 120,4 ao carbono C-20.

Os demais sinais apresentados nos espectros de RMN de  $^{13}C$  e de  $^1H$  foram quase idênticos aos apresentados para o limonóide nomilina e, portanto foi possível identificar o composto minoritário da mistura de fração FC4, como sendo o limonóide conhecido como nomilina. A Tabela 6 apresenta todos os dados para o limonóide nomilina com os seus dados descritos na literatura para este composto.

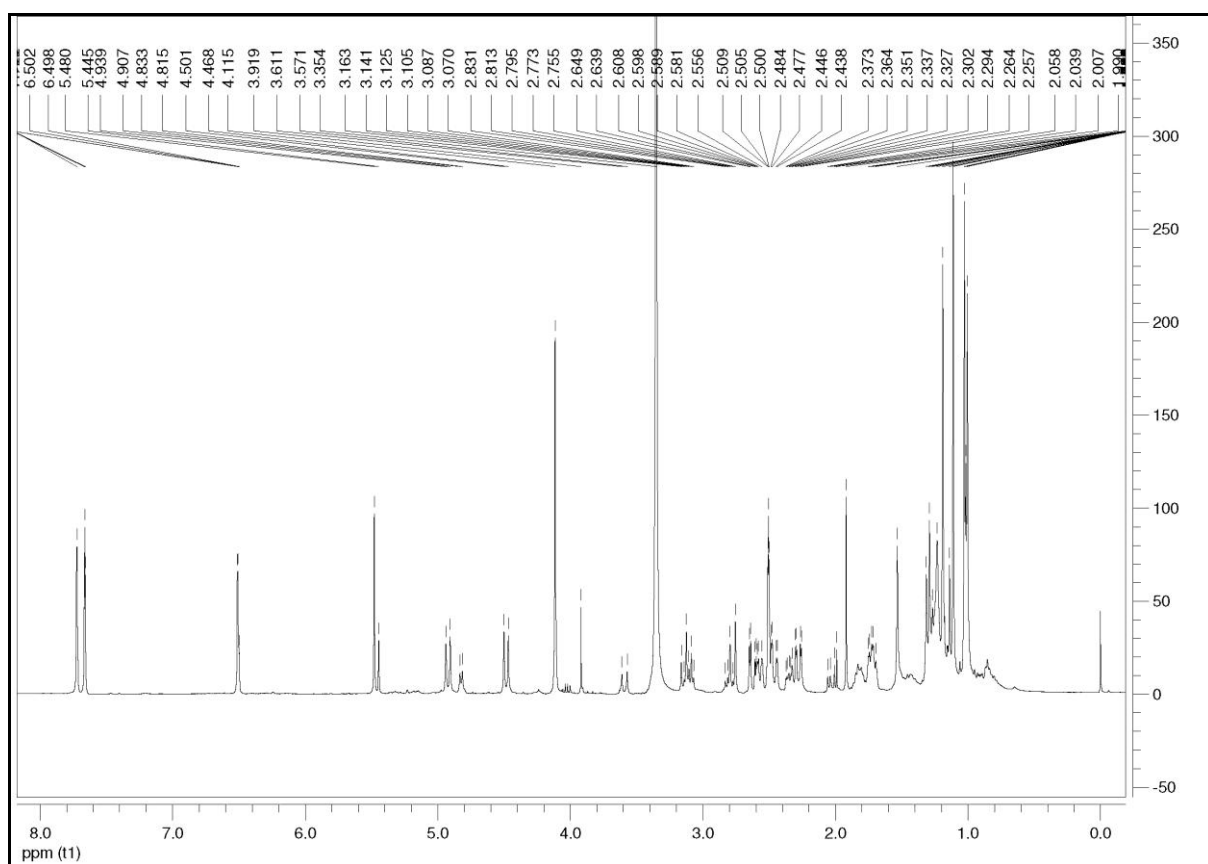


Figura 16 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (DMSO, 400MHz) da mistura FC4



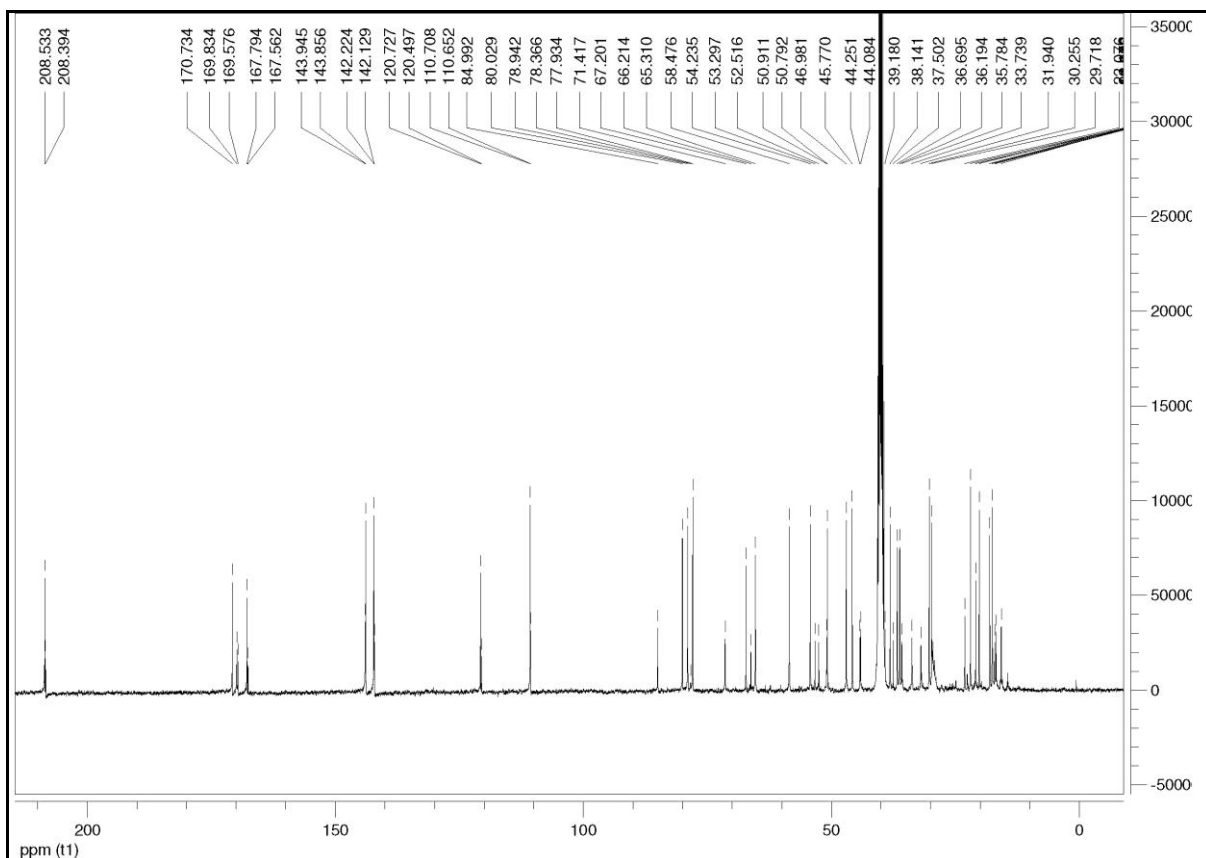


Figura 17 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (DMSO, 100MHz) da mistura FC4

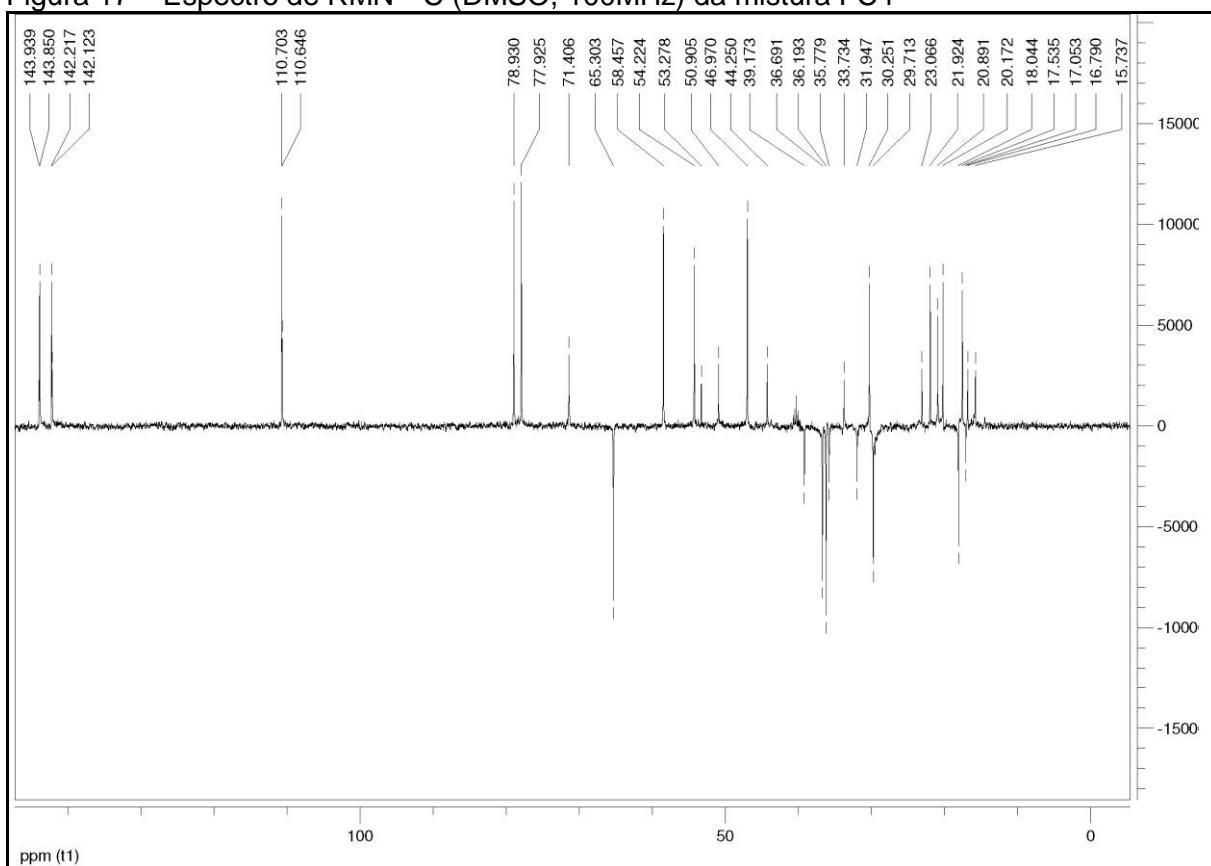


Figura 18 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de DEPT 135<sup>0</sup> (DMSO, 100MHz) da mistura FC4

Tabela 5 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  e do DEPT 135 $^0$  para FC4 e dados da literatura para limonina (FC4A)

	FC4A	FC4A	Khalil <i>et al.</i> (2003)	Khalil <i>et al</i> (2003)
C	$\delta_{\text{H (a)}}$ (ppm) m; <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{C (b)}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H (c)}}$ (ppm); m; <i>J</i> (Hz)	$\delta_{\text{C (d)}}$ (ppm)
1		78,3 (CH)		78.8
2		36,0 (CH <sub>2</sub> )		36.1
2 <sup>a</sup>	2.26 (dd <i>J</i> = 14,8 ; 3.2 Hz)		2.26 (dd <i>J</i> = 14,8 ; 3.2 Hz)	
2b	2.6 (dd <i>J</i> =14,8, 3.2 Hz)		2.65 (dd <i>J</i> =14,8, 3.2 Hz)	
3		170,0 (Cq)		170.3
4		79,9 (Cq)		79.5
5	2.44(dd, <i>J</i> =15,5; 3,3 Hz)	58,36 (CH)	2.47(dd, <i>J</i> =15, 2.8 Hz)	58.4
6		36,6 (CH <sub>2</sub> )		36.6
6a	2.75 (dd, <i>J</i> =15, 2.8 Hz)		2.75 (dd, <i>J</i> =15, 2.8 Hz)	
6b	3.10 (T, <i>J</i> = 15 Hz)		3.10 (T, <i>J</i> = 15 Hz)	
7		208.4 (Cq)		208.1
8		50,68 (Cq)		50.3
9	2.55 (dd, <i>J</i> =10, 3.2 Hz)	46,8 (CH)	2.55 (dd, <i>J</i> =10, 2.0 Hz)	46.9
10		48,66 (Cq)		45.3
11		17,9 (CH <sub>2</sub> )		19.7
11a	1.78 (m)		1.78 (m)	
11b	1.70 (m)		1.70 (m)	
12		29,60 (CH <sub>2</sub> )		29.3
12 <sup>a</sup>	1.26 (m)		1.26 (m)	
12b	1.73(m)		1.73(m)	
13		38,0 (Cq)		37.7
14		67,1(Cq)		64.9
15	4.10(s)	54,1 (CH)	4.09(s)	54.1
16		167,7 (Cq)		167.4
17	5.47(s)	77,8 (CH)	5.45 (s)	77.9
18	1.11 (3H, s)	17,43 (CH <sub>3</sub> )	1.09 (3H, s)	17.6
19		65,20 (CH <sub>2</sub> )		66.7
19 <sup>a</sup>	4.46 (d, <i>J</i> =13 Hz)		4.46 (d, <i>J</i> = 13Hz)	
19b	4.10 (d, <i>J</i> =13Hz)		4.09 (d, <i>J</i> =13Hz)	
20		120,6 (Cq)		120.3
21	7.66 (br s)	143,81 (CH)	7.63 (br s)	143.4
22	6.5 (br s)	110,6 (CH)	6.48 (br s)	110.2
23	7.66 (br s)	142,1 (CH)	7.69 (br s)	141.7
24	1.00 (s)	30,14 (CH <sub>3</sub> )	0.98 (s)	17.1
25	1.18 (3H, s)	20,06 (CH <sub>3</sub> )	1.17 (3H, s)	29.8
26	1.02 (3H, s)	21,8 (CH <sub>3</sub> )	1.01 (3H, s)	21.4

(a) DMSO- $d_6$ , 400 MHz

(b) DMSO- $d_6$  100 MHz

(c) DMSO- $d_6$  500 MHz

(d) DMSO- $d_6$  125 MHz

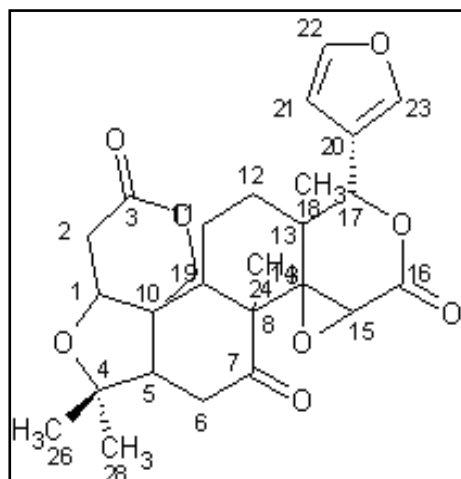


Figura 19- Estrutura da limonina

Tabela 6 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) de RMN  $^{13}\text{C}$  E DEPT 135<sup>0</sup> para FC4B e dados da literatura para nomilina

	FC4B	FC4B	Ruberto <i>et al.</i> (2003)	Ruberto <i>et al.</i> (2003)
C	$\delta_{\text{H (a)}}$ (ppm) m; J (Hz)	$\delta_{\text{C (b)}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H (c)}}$ (ppm); m; J (Hz)	$\delta_{\text{C (d)}}$ (ppm)
1	5.08 (d J=7Hz)	71.3 (CH)	5.08 (d J=7Hz)	71.3 (CH)
2		35.6 (CH <sub>2</sub> )		35.7 (CH <sub>2</sub> )
2 <sup>a</sup>	3.18 (dd J= 16,0 ; 1.5 Hz)		3.18 (dd J= 16,0 ; 1.5 Hz)	
2b	3.04 (dd J=16; 7 Hz)		3.04 (dd J=16; 7 Hz)	
3		169.7 (Cq)		169.7 (Cq)
4		84.88 (Cq)		85.4 (Cq)
5	2.29(dd, J=14; 3.2 Hz)	50.8 (CH)	2.29(dd, J=12; 3.5 Hz)	50.5 (CH)
6		39.0 (CH <sub>2</sub> )		21.2 (CH <sub>2</sub> )
6a	3.57 (d, J=16.1 Hz)		3.60 (dd, J=17, 3.5 Hz)	
6b	1.92 m		1.92 m	
7		208.3 (Cq)		158.3 (Cq)
8		52.4 (Cq)		46.6 s (Cq)
9	2.35 (d, J=8.4 Hz)	44.14 (CH)	2.39 (d, J=9Hz)	45.8 (CH)
10		43.97 (Cq)		44.7 (Cq)
11		16.9(CH <sub>2</sub> )		19.9 (CH <sub>2</sub> )
11a	1.52 (m)		1.52 (m)	
11b	1.20 (m)		1.20 (m)	
12		31.8 (CH <sub>2</sub> )		34.0 (CH <sub>2</sub> )
12a	1.80 (m)		1.80 (m)	
12b	1.17(m)		1.17(m)	
13		37.4 (Cq)		38.8 (Cq)
14		66.1(Cq)		65.6 (Cq)
15	3.90(s)	53.2 (CH)	3.72(s)	54.4 (CH)
16		165.0 (Cq)		169.6 (Cq)
17	5.44 (s)	78,8 (CH)	5.46 (s)	78.8 (CH)
18	1.28 (s)	22.9 (CH <sub>3</sub> )	1.20 (s)	22.0 (CH <sub>3</sub> )
19		15,6 (CH <sub>3</sub> )		17.0 (CH <sub>3</sub> )
19a	1.31 (s)		1.21 (s)	
19b				
20		120,4 (Cq)		120.7 (Cq)
21	7.66 (sl)	142.0 (CH)	7.39 (bs)	141.3 (CH)
22	6.49 (sl)	110.5 (CH)	6.34 (bs)	110.1 (CH)
23	7.66 (sl)	143.8 (CH)	7.39 (bs)	143.5 (CH)
24	1.53 (s)	23,6 (CH <sub>3</sub> )	1.52 (s)	24.3 (CH <sub>3</sub> )
25	1.53 (s)	20,7 (CH <sub>3</sub> )	1.54 (s)	18.1 (CH <sub>3</sub> )
26	1.23 (s)	16.68 (CH <sub>3</sub> )	1.12 (s)	17.7 (CH <sub>3</sub> )
CH <sub>3</sub> CO		169.4 (Cq)		169.6 (Cq)
CH <sub>3</sub> CO	2.00 (s)		2.00 (s)	21.2 (CH <sub>3</sub> )

(a) DMSO-d<sub>6</sub>, 400MHz

(b) DMSO-d<sub>6</sub> 100 MHz

(c) CDCl<sub>3</sub> 250 MHz

(d) CDCl<sub>3</sub> 63 MHz

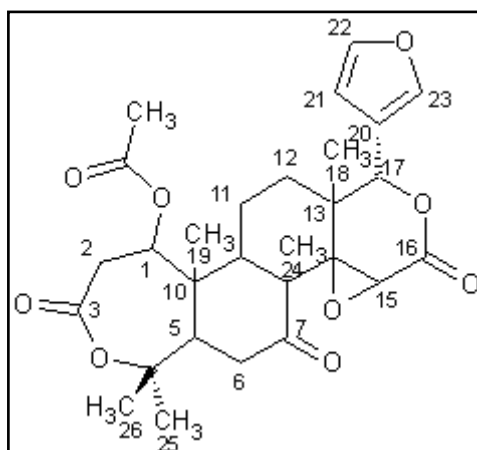


Figura 20 – Estrutura do limonóide nomilina

## 5.6 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

É muito importante manter a hidratação da pele, por esta razão a utilização de produtos emolientes em formulações é bastante utilizada. A maioria dos óleos vegetais apresenta emoliência, oclusividade, adesividade, brilho e solvência, diferenciando-se por sua constituição química, que pode promover efeitos bioquímicos diversos na pele (MORAIS, 2006; AZZINI, 1999).

Os óleos vegetais fixos são extraídos de várias partes das plantas, porém as sementes são bastante utilizadas por conterem quantidades maiores deste óleo. São compostos principalmente por triglicérides, ésteres triplos de ácidos graxos e de glicerol. Os ácidos graxos que participam da formação destes ésteres são em sua maioria o ácido oléico, o ácido linoleico e o ácido linolênico (MORAIS, 2006).

O óleo fixo (FH) da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foi caracterizado por meio de CG-EM e repetiu-se a análise por CG por comparação com o índice de Kovats (ADAMS, 1995), em diferentes condições.

#### 5.6.1 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Na análise de CG-EM o óleo foi analisado imediatamente após a derivatização dos ácidos graxos presentes sob a forma de metilésteres, pois os ésteres são derivados mais voláteis que os ácidos de origem facilitando desta forma a análise.

O óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foi caracterizado por CG-EM, sob as condições especificadas anteriormente nas condições no item 4.1.5.1 pág. 51.

Na Figura 21 mostra o cromatograma obtido a partir do óleo das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck , e a Tabela 7 resume a ordem de eluição dos ésteres graxos identificados no óleo, com seus respectivos tempos de retenção, e teores (%) contidos na amostra analisada por meio da área do pico.

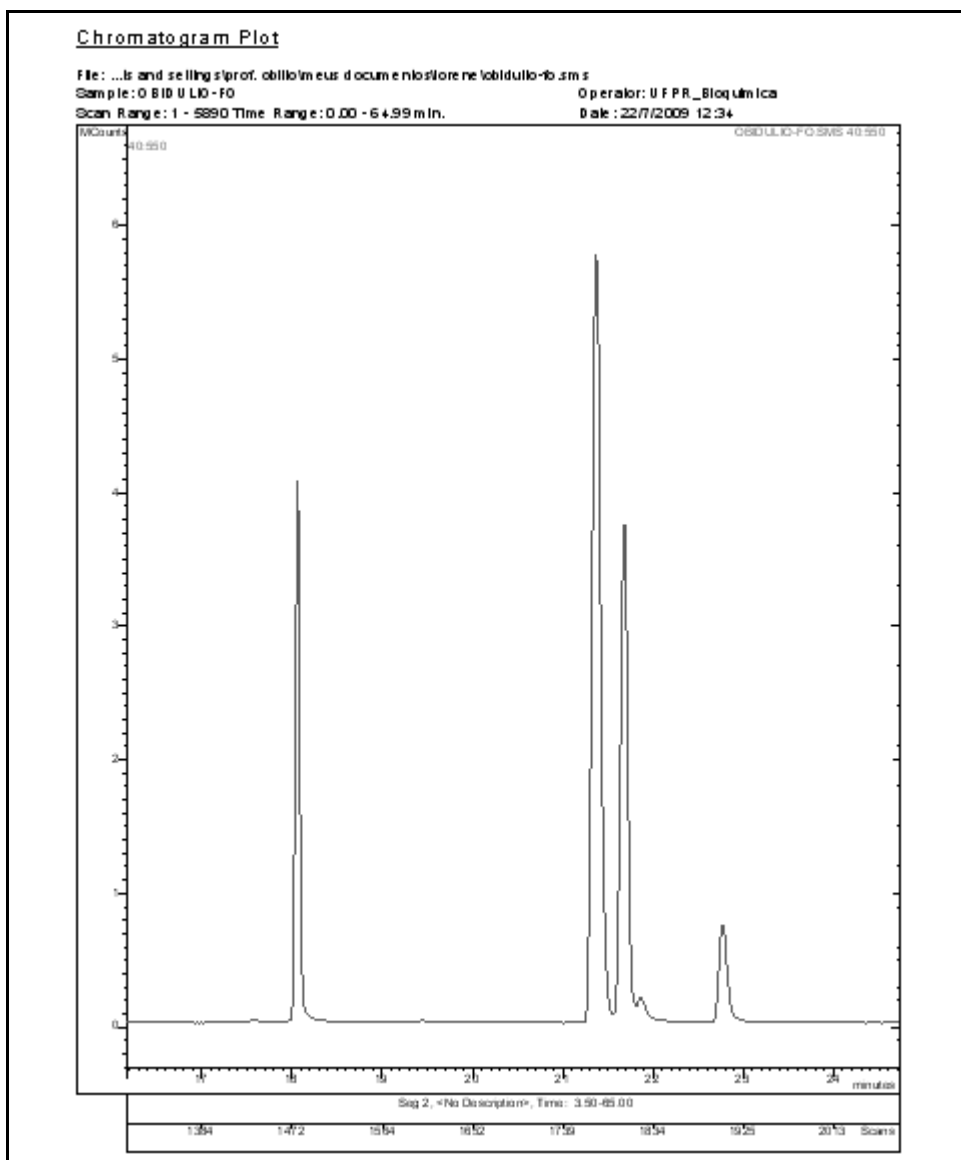


Figura 21 – Cromatograma I do Óleo da Semente *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (FH)

Tabela 7 – Ácidos Graxos identificados com seus respectivos teores (%) do Óleo da Semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (FH)

Éster Metílico dos Ácidos	Tempo de Retenção no Cromatograma (min)	% Teor
Ácido palmítico	18:06	18.3
Ácido Linoleico	21:37	49.7
Ácido Oléico	21:67	26.3
Ácido Esteárico	22:76	5.4

A análise por CG-EM do óleo derivatizado (Figuras 22, 23, 24, 25) mostrou ser este composto majoritariamente de quatro ácidos graxos que juntos perfazem 99% do óleo, sendo o ácido linoleico, um ácido graxo poliinsaturado, o mais

representativo no óleo (49%), seguido do ácido oleico (26%). A análise dos componentes do óleo foi realizada com base na fragmentação de massas dos respectivos ácidos graxos na forma de éster metílico, separado na cromatografia gasosa. Os picos dos íons moleculares pelas suas massas cargas ( $m/z$ ) correspondentes foram caracterizados, atribuindo-se as fórmulas moleculares dos ácidos graxos derivatizados, conforme mostrado na Tabela 8 seguinte.

Tabela 8 – Íons moleculares e ácidos graxos derivatizados correspondentes

Íon Molecular M + ( $m/z$ )	Pico base	Fórmula molecular	Atribuição
270	87	$C_{17}H_{34}O_2$	Éster metílico do ácido palmítico (fig.22)
298	87	$C_{19}H_{38}O_2$	Éster metílico do ácido esteárico (fig.23)
296	81	$C_{19}H_{36}O_2$	Éster metílico do ácido oléico (fig.24)
294	81	$C_{19}H_{34}O_2$	Éster metílico do ácido linoleico (fig.25)

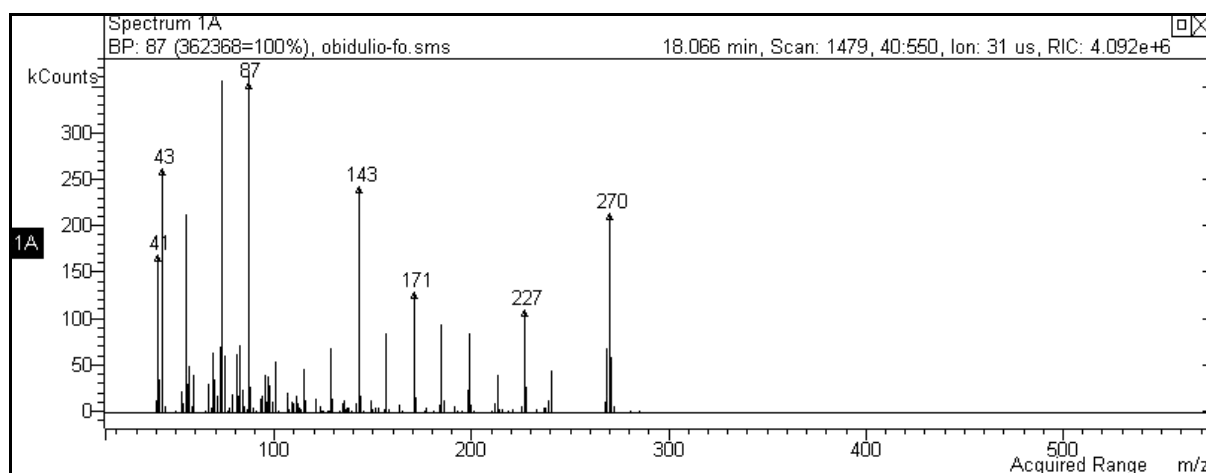


Figura 22 – Espectro de Massas do Éster Metílico do Ácido Palmítico ( $C_{17}H_{34}O_2$  / PM=270)



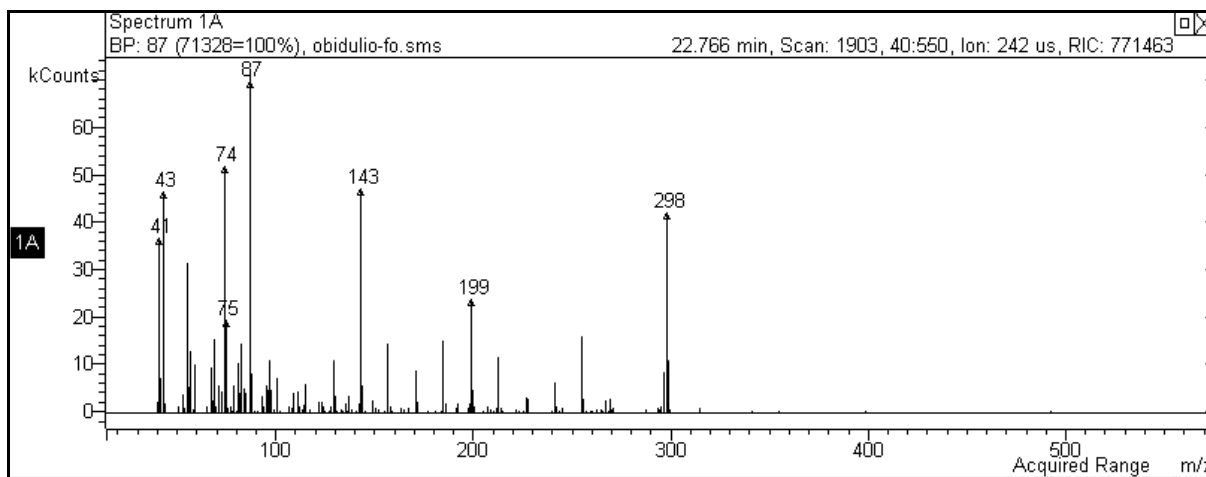


Figura 23 – Espectro de Massas do Éster Metílico do Ácido Esteárico ( $C_{19}H_{38}O_2$  / PM=298)

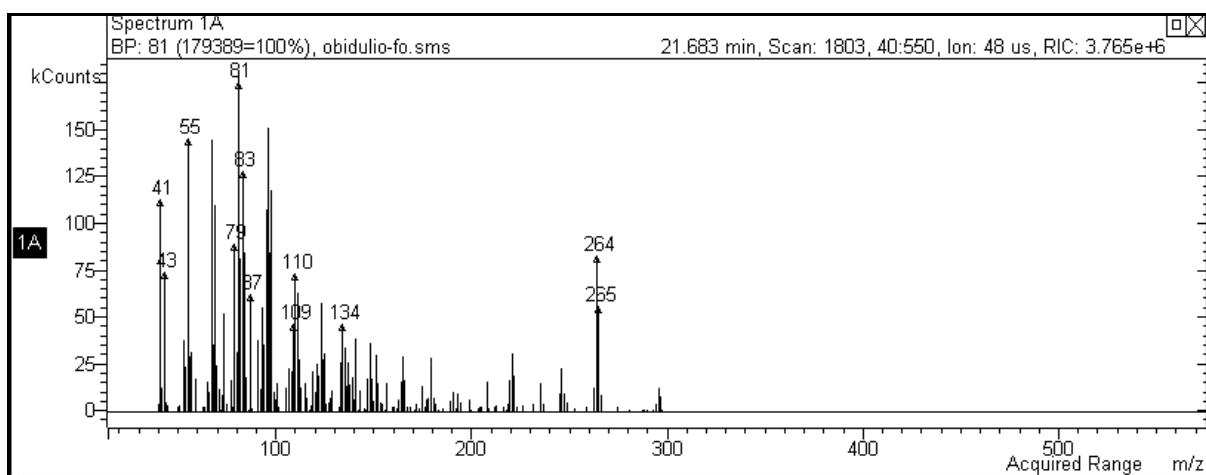


Figura 24 – Espectro de Massas do Éster Metílico do Ácido Oléico ( $C_{19}H_{36}O_2$  / PM=296)

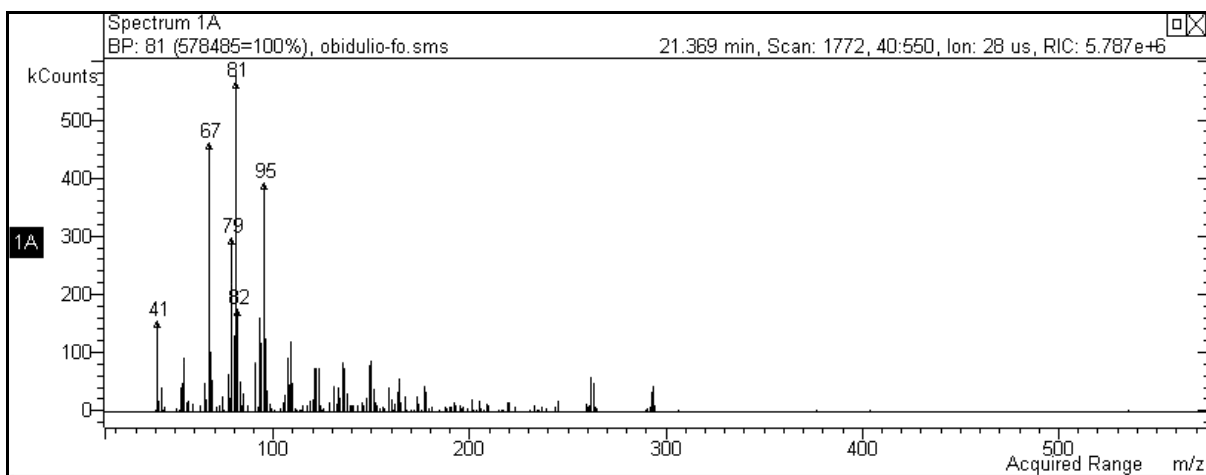


Figura 25 – Espectro de Massas do Éster Metílico do Ácido Linoleico ( $C_{19}H_{34}O_2$  / PM=294)

### 5.6.2 Cromatografia gasosa (CG)

Foi também realizada a análise para caracterização do óleo fixo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (FH) pela análise em CG por comparação com o índice de Kovats (ADAMS, 1995).

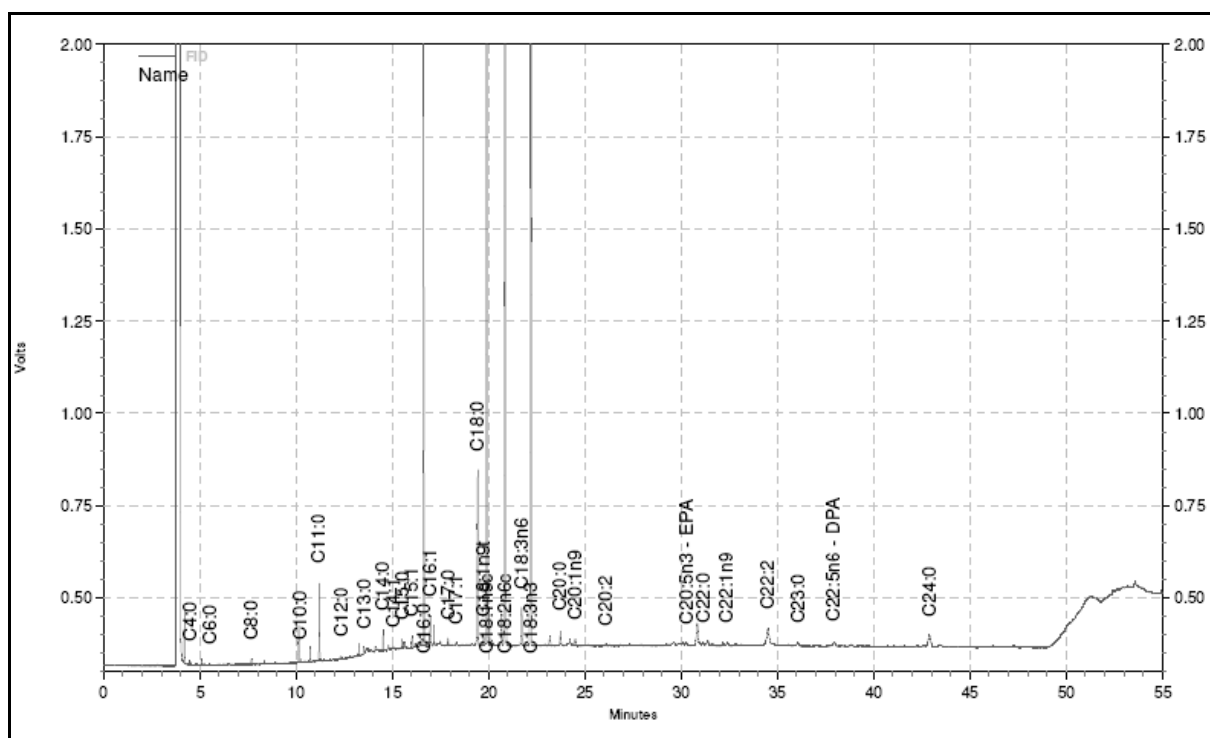


Figura 26 – Cromatograma II (CG) do Óleo da Semente *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (Fração hexânica)

Tabela 9 – Ácidos Graxos identificados com maiores teores (%) da amostra do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck analisada por meio da área do pico.

Nome Ácido graxo	Tempo de retenção no cromatograma (min)	Concentração (%)
Ácido palmítico	16:61	9.7
Ácido Esteárico	19:42	3.3
Ácido Oléico	19:89	17.8
Ácido Linoleico	20:85	36.3
Ácido $\alpha$ -linolênico	22:19	25.3

Foram elucidados na Tabela 9 apenas 5 ácidos graxos, ou seja, aqueles que maiores obtiveram % total da área no cromatograma, sendo 3 deles insaturados. Dentre os ácidos graxos que apresentaram maior quantidade no óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, o ácido palmítico (C16:0), foi que apresentou menor tempo de retenção no cromatograma. Seguidamente o cromatograma, revelou os picos correspondentes aos ácidos: esteárico (C18:0), oléico (C18:1), linoleico (C18:2) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3). Este resultado denota que o tamanho da cadeia graxa exerce maior influência na ordem de eluição do que o número de insaturações na cadeia principal do composto, ou seja, quanto menor a cadeia menor o tempo de retenção no cromatógrafo (PEREIRA, 2008).

Os ácidos graxos insaturados, oléico, linoleico,  $\alpha$ -linolênico eluíram em maior tempo de retenção. Aparecem em quantidades expressivas, sendo a maior parte ácidos graxos poliinsaturados. Estes resultados coloca esse fruto em uma condição atraente para o mercado de alimentos funcionais e expressam a importância do aproveitamento industrial, já que os compostos insaturados representam cerca 80% da composição do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, sendo 61% poliinsaturados.

Esta característica auxilia na agregação de valor do fruto, pois o uso de matérias-primas ricas em ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados são de grande interesse para as indústrias que buscam alternativas para elaboração de produtos mais saudáveis (NASCIMENTO *et al*, 2008)

Filsoof e Mehran (1976) investigaram a composição de ácidos graxos de óleos de sementes de oito espécies de *Citrus* oriundo do Irã, dentre elas, pode-se citar: laranjas, tangerina e limões, cujos valores para os ácidos graxos majoritários foram: 21,8-29,4% (ácido palmítico), 3,1-7,60% (ácido esteárico), 0,3-1,3% (ácido palmitoléico), 23,5-32,3% (ácido oléico), 33,5-39,8% (ácido linoleico) e 3,1-7,6% (ácido linolênico). Pequenas quantidades (até 0,1%) de ácidos mirístico e araquídico.

Habib *et al.* (1986) investigaram a composição química das sementes de espécies de *Citrus* do Egito. Foram analisadas as sementes das frutas cítricas laranja, tangerina, limão e toranja. Eles acrescentaram que, o aspecto nutricional óleos das sementes de *Citrus* são semelhantes a outros óleos vegetais com um conteúdo relativamente alto de ácido linoleico e linolênico.

Trandjiiska e Nguyen (1989) estudaram a composição de triacilglicerídeos dos óleos de sementes de espécies de *Citrus* do Vietnã. As análises demonstraram que ácido linoleico é o ácido graxo mais importante em todas as sementes de *Citrus*, exceto para o limão, no qual o teor de ácido oléico foi o mais importante.

Em trabalho de Ajewole e Adeyeye (1993) sobre composição do óleo de sementes de *Citrus*, os gêneros estudados incluem *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *C. paradisi*, *C. aurantium*, *C. reticulata*, *C. aurantifolia* e tangelo (um híbrido entre *C. paradisi* e *C. reticulata*) e os principais ácidos graxos encontrados foram palmítico (12 a 28%), oléico (entre 26 e 45%) e linoleico (entre 29 e 38%). Foi encontrado também ácido esteárico e linolênico. Os óleos apresentaram alto grau de insaturação, entre 67 e 86 %.

Segundo Akpata e Akubor (1999) o óleo de sementes de *Citrus* contém alta quantidade de ácidos graxos insaturados, sendo valioso na aplicação de Indústrias de alimentos e outras aplicações industriais.

Estudos de Fernandes *et al.*, (2002), no qual foi extraído o óleo da semente de frutas cítricas do Brasil. Foram encontrados na extração por soxhlet Ácido palmítico (*C.limon*) 29,8%, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 53,9%, (*C. reticulata*) 38,6%. Ácido linoleico (*C.limon*) 24,1%, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 29,6%, (*C. reticulata*) 30,5%. Ácido linolênico (*C.limon*) 38,7%, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 13,5%, (*C. reticulata*) 19,9%. Ácido. oléico (*C.limon*) 2,4%, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 0,7%, (*C. reticulata*) 2,1%. Ácido esteárico (*C.limon*) 5,0%, (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) 2,3%, (*C. reticulata*) 8,9%.

Sementes de variedades de frutas cítricas da Tunísia, ou seja, Laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), Limão (*Citrus limon*), bergamota (*Citrus bergamia*) e laranja amarga (*Citrus aurantium*) foram analisados a composição. Os principais ácidos graxos encontrados foram palmítico, oléico e linoleico. Observou-se que os ácidos graxos insaturados são mais abundantes do que os ácidos graxos saturados (SAÏDANI, DHIFI, MARZOUK, 2004).

Reda *et al.*, (2005) identificaram no óleo das sementes de limão rosa do Brasil os seguintes ácidos graxos na forma de ésteres metílicos: caprílico (0,90%), palmítico (21,40%), esteárico (2,60%), oléico (21,20%), linoleico (43,00%), linolênico (7,60%) e araquídico (0,20%) e no óleo das sementes de limão siciliano: caprílico (1,00%), mirístico (0,10%), palmítico (19,60%), esteárico (3,00%), oléico (28,60%), linoleico (34,40%), linolênico (10,00%) e araquídico (0,20%). Os resultados

indicaram que ambos os óleos composição química semelhante e alto teor de ácidos graxos insaturados (71,80 e 73,00%).

Em estudo de Anwar *et al.* (2008) sobre a composição química de óleos extraídos de sementes cítricas do Paquistão aparece o ácido linoleico (36,1-39,8%), ácido palmítico (25,8 - 32,2%), ácido oléico (21,9 - 24,1%), ácido linolênico (3,4 - 4,4%) e o ácido esteárico (2,8 - 4,4%).

Waheed *et al.* (2009) pesquisaram três espécies de *Citrus*, *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, *Citrus paradisi*, *Citrus aurantium* do Paquistão, no qual analisou os constituintes de lipídeos totais e classes de lipídios neutros, ou seja, os hidrocarbonetos, ésteres de cera, ésteres de esterol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, 1,3-diacilgliceróis, 1,2-diacilgliceróis, esteróis, álcoois, e monoacilgliceróis. Ácido Palmítico, linoleico e oléico foram os principais componentes das classes lipídicas estudadas das sementes de *Citrus*.

Estes resultados demonstram que as sementes cítricas são fonte potencial de óleo e também de aplicabilidade em áreas industriais. O resultado encontrado neste trabalho se assemelha com os resultados encontrados em pesquisas anteriores com sementes cítricas.

#### 5.6.2.1 Identificação da subfração FC2

A subfração (FC2) foi também analisada por meio de Cromatografia Gasosa de acordo com a Figura 27.

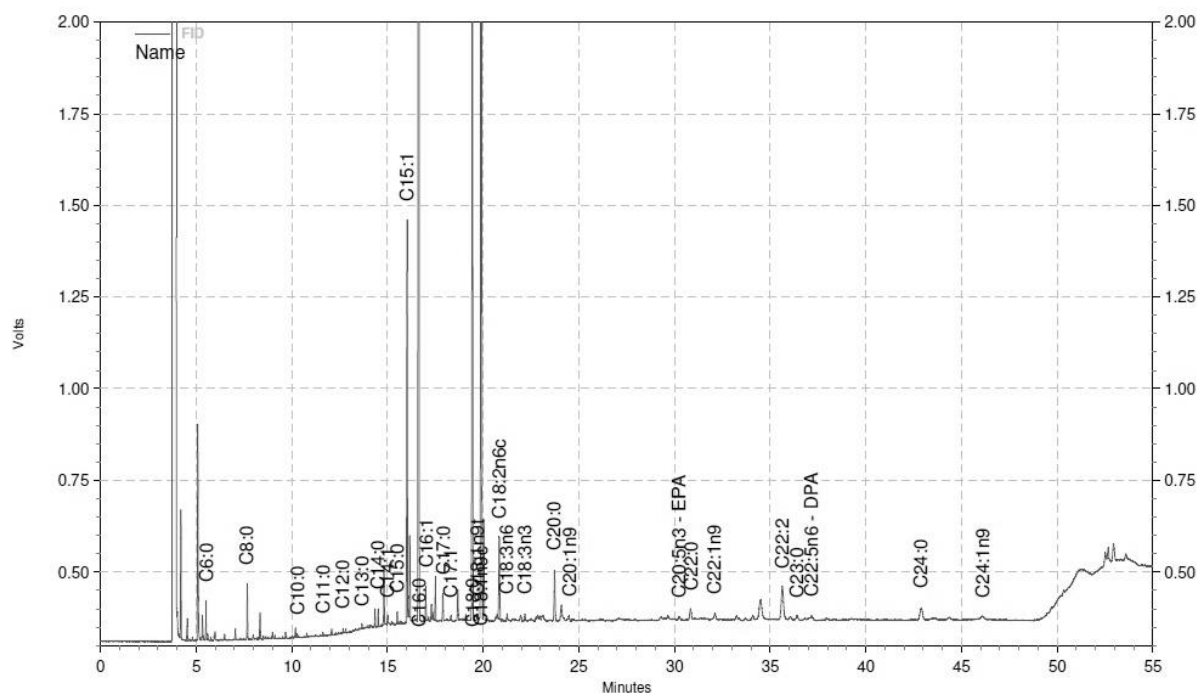


Figura 27 – Cromatograma do Óleo da Fração Clorofórmio (subfração FC2)

Tabela 10 – Ácidos Graxos encontrados com maiores teores (%) do componente FC2 analisada através da área do pico

Éster Metílico dos Ácidos	Tempo de Retenção no Cromatograma (min)	Teor %
Pentadecenóico	16:02	4.5
Palmídico	16:63	52.6
Esteárico	19:43	10.9
Oléico	19:90	22.9
Linoleico	20:84	1.3

Foram elucidados na Tabela 10 apenas 5 ácidos graxos, ou seja, aqueles que maiores obtiveram % total da área no cromatograma, sendo 3 deles insaturados. Dentre os ácidos graxos que apresentaram maior quantidade em FC2 foram o ácido pentadecenóico (C15:1), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) e linoleico (C18:2).

Tabela 11 – Comparação entre a fração hexânica e o FC2 da fração clorofórmica

Éster Metílico dos Ácidos	% Teor FC2	% Teor Fração Hexânica (CG-EM)	% Teor Fração Hexânica (CG), por Kovats
Ácido palmídico	52.6	18,3	9.7
Esteárico	10.9	5,4	3.3
Oléico	22.9	26,3	17.8
Linoleico	1.3	49,7	36.3
$\alpha$ -linolênico	0.1	-	25.3
Pentadecenóico	4.5	-	0.2

Os resultados do CGMS e CG do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (FH) apresentaram desigualdade na composição dos ácidos graxos, pois foram realizadas em condições diferentes. Em ambos os casos, houve predominância dos ácidos graxos monoinsaturados (26% e 17%) e de ácidos graxos poliinsaturados (50% a 61%). Já FC2 apresentou elevado teor de ácidos graxos saturados.

#### 5.6.3 Comparação da composição centesimal graxa insaturada e saturada do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, FC2 com outros óleos vegetais

Na análise da Fração Hexânica foi obtida uma proporção de aproximadamente 80 % de ácidos graxos insaturados para apenas 20% de saturados. Já a análise o FC2 apresentou-se com maior proporção de ácidos graxos saturados em comparação com os insaturados, saturado 67,1% e insaturado 32,1%. Segue na Tabela 12 a comparação da relação graxa insaturada/saturada da FH (resultados analisados por CG), FC2 e alguns óleos utilizados industrialmente.

Tabela 12 – Relação da composição graxa insaturada/ saturada em relação a alguns óleos utilizados na área cosmética

Óleo Vegetal	Relação ácido graxo insaturado / saturado
Óleo da semente de <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck	5,05
FC2	0,47
Óleo da semente de camomila	5,1
Óleo de amêndoas doces	15,6
Óleo de Andiroba	2,0
Óleo de babaçu	0,17
Óleo de Buriti	4,60
Óleo de Castanha do Pará	2,80
Óleo de Pequi	1,14

Fonte: Adaptação PEREIRA, 2008

Por meio da comparação da relação insaturado/saturado da FH com a subfração FC2 e outros óleos da flora brasileira, foi verificado uma relação de 5.05, sendo bastante elevada em comparação aos outros óleos, igualando ao óleo da semente da chamomila. O óleo de amêndoas teve destaque com relação de 15,6, devido apenas ao ácido oleico e não aos ácidos poliinsaturados, entretanto a relação poliinsaturado/monoinsaturado também torna-se um resultado significativo.

## 5.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO

### 5.7.1 Parâmetro reológico de viscosidade e fluidez

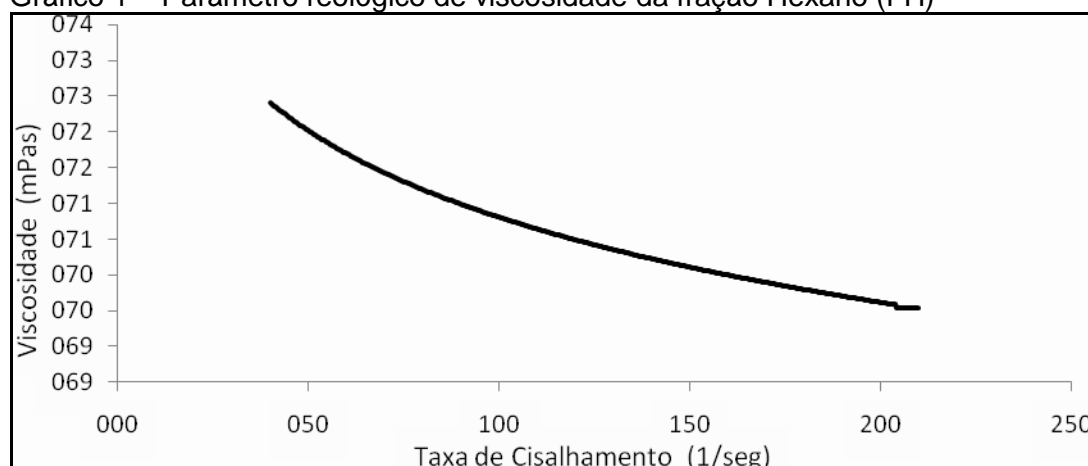
A reologia demonstra informações sobre as propriedades de escoamento e deformação de materiais sob a influência de forças externas (CAMARGO JÚNIOR, 2006). Os materiais podem apresentar dois diferentes tipos de comportamento de acordo com as características de fluxo: Newtonianos e não Newtonianos. O fluxo Newtoniano apresenta valores constantes de viscosidade, o fluxo não Newtoniano apresenta modificação na viscosidade em relação aumento da tensão de cisalhamento. Os fluxos não Newtonianos pseudoplásticos apresentam diminuição



nos valores de viscosidade em relação ao aumento da tensão de cisalhamento (MARTIN, BUSTAMANTE, CHUN, 1993). Este fluxo é o mais comum e mais interessante para os produtos cosméticos, que muitas vezes necessitam de uma viscosidade inicial adequada, e um determinado índice de fluidez no momento da aplicação, permitindo um bom espalhamento e uma melhor cobertura da pele (DAHMS, 1996).

O óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck apresentou comportamento não-Newtoniano, ou seja, sua viscosidade é dependente da taxa de cisalhamento. É classificado quanto ao tipo de escoamento, sendo um óleo que exibe comportamento pseudoplástico, que se caracteriza pela diminuição da resistência do material ao escoamento com o aumento da velocidade de deformação de acordo com o Gráfico 1. Apresentou índice de fluxo igual a 0,96, ou seja, menor que 1 ( $<1$ ), esta informação indica que o óleo possui comportamento pseudoplástico sendo ideal para uso em cosméticos, pois após a aplicação do produto, este apresenta facilidade em espalhar na pele e o filme aplicado à pele poderá recuperar viscosidade rapidamente.

Gráfico 1 – Parâmetro reológico de viscosidade da fração Hexano (FH)



Fonte: A autora, 2010

### 5.7.2 Densidade

A densidade média obtida no presente estudo foi de 0,907mg/mL. Este resultado apresentou-se semelhante em relação a algumas pesquisas já realizadas. Os resultados da densidade (24°C) de acordo com Anwar *et al.* variou de 0,920mg/mL – 0,941mg/mL. Habib *et al.* (1986) relatou que óleos das sementes *Citrus* Egípcio, apresentou densidade (0,913 mg/mL – 0,933 mg/mL). A pesquisa de El-Adawy *et al.* (1999) para óleos de sementes de *Citrus* egípcio apresentou densidade 0,884mg/mL – 0,962mg/mL.

### 5.7.3 Espalhabilidade (Comportamento de extrusão)

As medidas foram realizadas e o resultado obtido para o óleo foi uma área de 10.381, 62mm<sup>2</sup>, sendo considerado um ótimo poder de espalhabilidade. A Figura 28 mostra seu comportamento sob a placa após o tempo de um minuto.

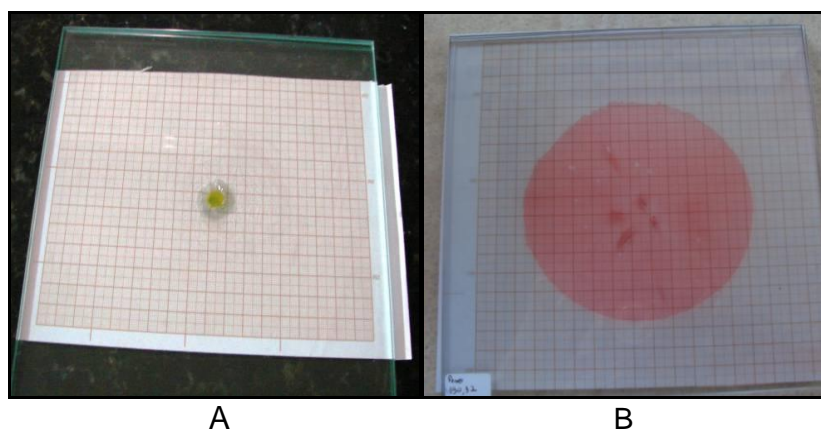


Figura 28 – Análise de Espalhabilidade da Fração Hexano (FH), [A] Tempo zero e [B] Após 1 minuto.

Fonte: A autora, 2010

## 5.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados obtidos na determinação da Concentração Inibitória Mínima do extrato bruto da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foram avaliados de acordo com a presença de coloração vermelha nos poços. Resultados acima de 1000 µg/L para o extrato bruto indicam que não houve inibição do crescimento bacteriano, enquanto que, resultados abaixo desse valor demonstram atividade.

O controle positivo e negativo comportou-se conforme esperado. De acordo com os resultados apresentados, as amostras não inibiram o crescimento de microorganismos pelo método CIM. Pode-se dizer, no entanto, que o extrato bruto não apresenta atividade antimicrobiana.

Estudo realizado com o óleo essencial, obtido a partir da casca da Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco) frente às cepas *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, demonstrou atividade de inibição com o óleo. Os resultados obtidos indicam que o óleo essencial isoladas de Ponkan tem atividade antimicrobiana e pode ser usado para controlar microorganismos (TAO *et al.*, 2009).

No estudo de Pereira *et al.* (2008) com óleo fixo da semente de chamomila, comprovou que este óleo com alto teor de ácidos linoleico e oléico foi capaz de inibir cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*.

Costa (2007) no estudo da atividade antibacteriana com óleo de urucum nas concentrações de 1000, 500, 250 e 125 µg, composto por ácidos graxos insaturados também não apresentou atividade contra as bactérias testadas.

Será necessário testar outros métodos de análises e outras cepas para verificar a possibilidade de inibição bacteriana com óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

## 5.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser de origem natural ou sintética e podem ser adicionados em produtos alimentícios, cosméticos e outros para retardar os

processos oxidativos, que causam mudanças na qualidade e aspecto dos produtos. Os antioxidantes atuam interrompendo a cadeia de reações oxidativas, reduzindo a velocidade de oxidação e prolongando o período de indução, que consiste no tempo decorrido para um produto começar a apresentar sinais detectáveis de oxidação (AMAROWICZ *et al.*, 2004).

Atualmente pesquisas estão voltadas em busca de produtos antioxidantes naturais, pois existem dúvidas em relação à segurança dos produtos sintéticos utilizados no mercado.

#### 5.9.1 Formação do complexo fosfomolibdênico

A Formação do Complexo Fosfomolibdênico baseia-se na redução do molibdênio (VI) para molibdênio (V) quando em contato com alguma substância que tenha ação antioxidante, com formação de um complexo verde fosfomolibdênico (V) em pH ácido, que é determinado espectrofotometricamente por UV a 695 nm (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999). Esse método é usado para comparar a capacidade antioxidante de diversos extratos, além de ser simples e de baixo custo.

Os padrões utilizados para comparar com as frações foram vitamina C e rutina. Considerou-se que a vitamina C apresenta atividade de 100% por ser uma substância de potente ação antioxidante. Desta forma, de acordo com as análises realizadas a rutina apresentou atividade antioxidante aproximadamente 29% em relação à vitamina C. As frações, por sua vez, quando comparado à vitamina C, possuem a resultados citadas no Gráfico 2 e Tabela 13.

Comparando os resultados em relação à rutina e a Vit C, as frações mostraram baixa ação antioxidante. Visualmente na Figura 29 percebe-se que houve pouca mudança de cor das soluções em 90 minutos de reação. Normalmente quando durante a análise nota-se a mudança de coloração amarela para cor verde/azulada indica característica da formação do complexo fosfomolibdênico, ou seja, ação antioxidante. Quanto mais intensa a coloração, maior a atividade antioxidante do composto.

Nota-se que o tubo 1 das Figura 29 é a Vit C, pois apresenta maior coloração, seguida da rutina com azul menos intenso, os restantes dos tubos são análises das frações testadas e estes apresentam menor coloração.

Pode-se concluir com essa análise que a FM apresenta atividade antioxidante maior em relação às outras frações analisadas.

Gráfico 2 – Porcentagem de inibição do complexo do Fosfomolibdênio em relação à vitamina C

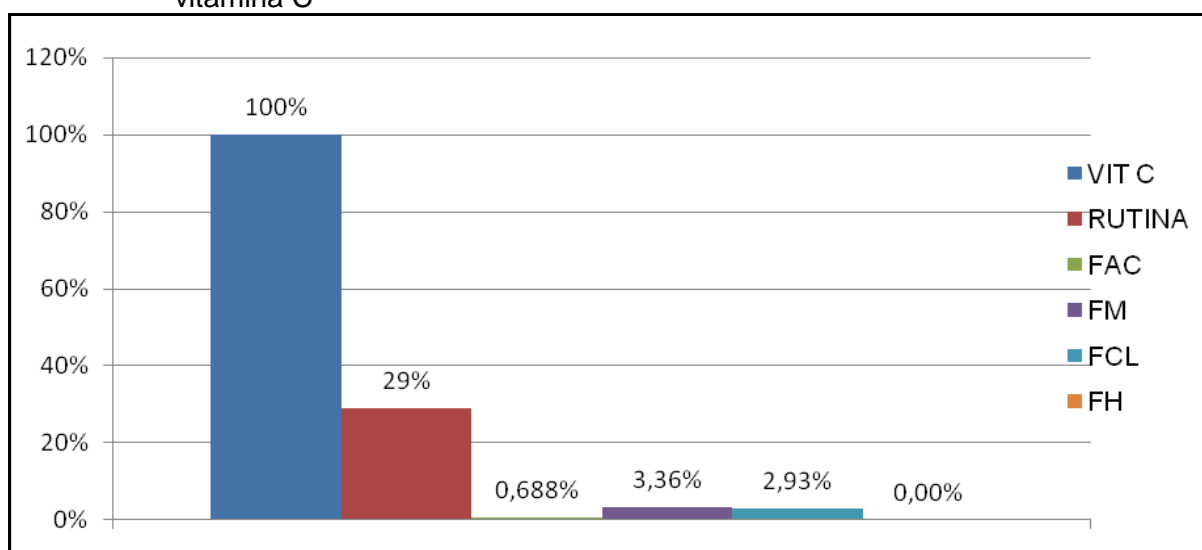


Tabela 13 – Resultados da atividade antioxidante pela redução do complexo do fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à Rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à Vitamina C (%)
FM	11,586	3,36
FCL	10,103	2,93
FAC	2,372	0,688
FH	0,00	0,00

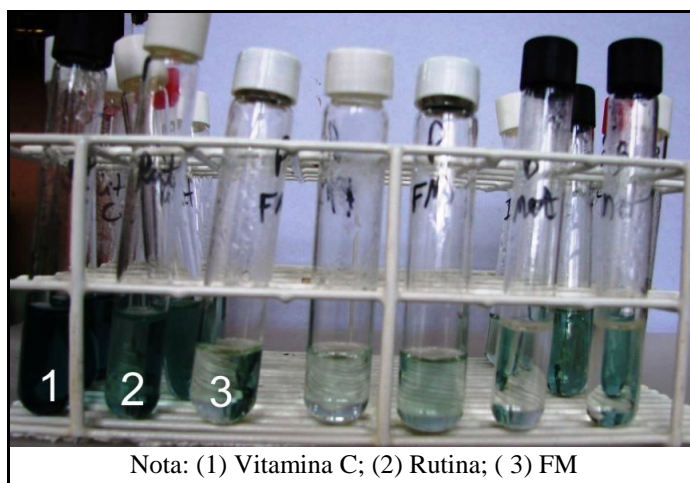


Figura 29 – Visualização da reação de complexação do fosfomolibdênio.- fração Metanol

Fonte: A autora, 2009

### 5.9.2 Redução do radical DPPH

O DPPH quando entra em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, o radical passa à sua forma reduzida perdendo a coloração violeta e se tornando amarelo pálido, formando difenil picrilhidrazina. A intensidade da coloração é proporcional à concentração da substância com potencial antioxidante (HIRATA, 2004).

Para a fração metanol (FM) e a fração acetato de etila (FAC) foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o  $IC_{50}$ , ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. No Gráfico 3 e 4 demonstra as retas médias obtidas da FM e FAC.

Cada amostra foi comparada com os padrões de vitamina C e rutina. Quanto menor for o valor do  $IC_{50}$ , maior é a capacidade antioxidante da substância. Nas Figuras 30 e 31 demonstraram a perda de coloração quando a fração possui capacidade antioxidante. Os resultados do  $IC_{50}$  são apresentados na Tabela 14, corresponde à média das repetições  $\pm$  desvio padrão.

Os resultados foram analisados estatisticamente, para verificar a diferença estatística entre as amostras utilizou-se ANOVA, e para localizar as diferenças o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Por meio destas análises verificou-se que todas às amostras diferem estatisticamente entre si. As FM e FAC possuem atividade antioxidante menor que à Vit C e Rutina. Através da média da equação da reta obtida nos Gráficos 3 e 4 e considerando que o valor de y: 50, tem-se como resultado ( $0,33 \text{ mg/mL} \pm 0,66$ ) para a FM e ( $0,39 \text{ mg/mL} \pm 0,60$ ) para FAC. Este valor significa que é necessária esta concentração para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

As frações hexano e clorofórmio apresentaram atividade antioxidante acima de  $500 \mu\text{g/mL}$ , sendo considerada uma atividade fraca, são menos ativas do que os padrões e amostras analisadas, sendo necessário uma quantidade maior de amostra para reduzir 50% da concentração de DPPH.

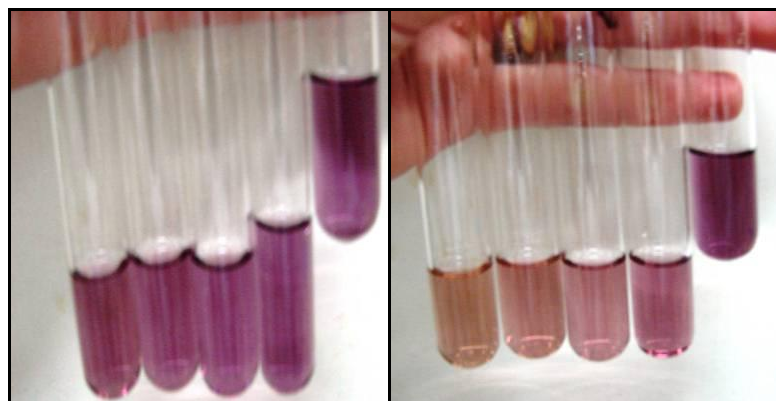
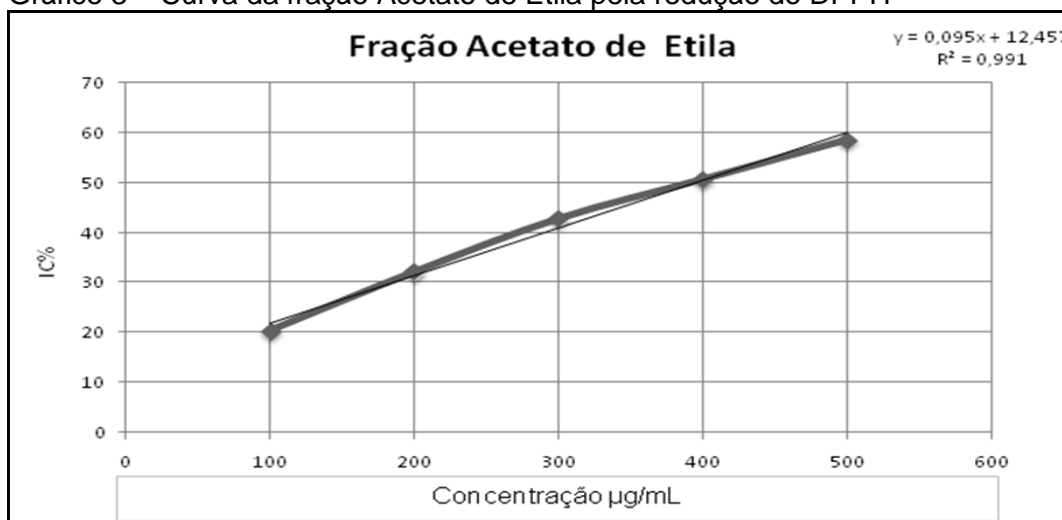


Figura 30 – Análise DPPH da fração acetato de etila (FAC)  
Fonte: A autora, 2009

Gráfico 3 – Curva da fração Acetato de Etila pela redução do DPPH



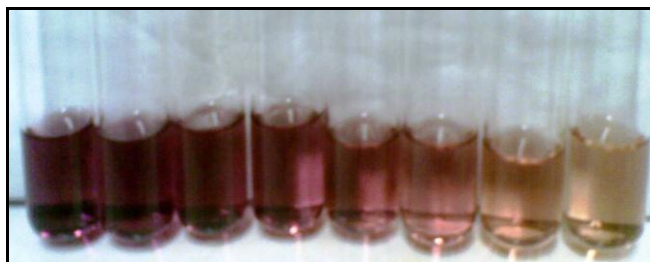


Figura 31 – Análise DPPH da fração metanol (FM)  
Fonte: A autora, 2009

Gráfico 4 – Curva da fração Metanol pela redução do DPPH

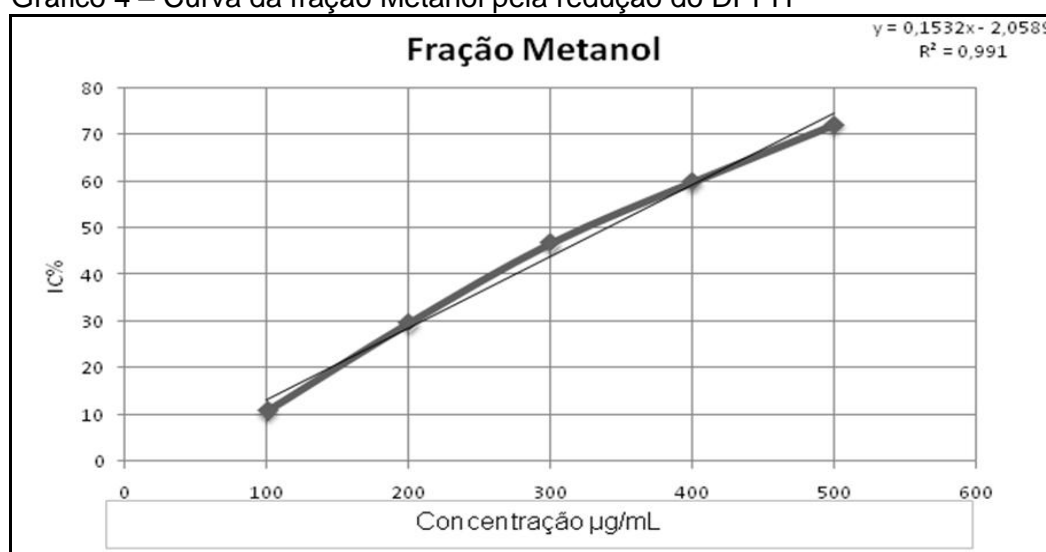


Tabela 14 – Resultado de IC<sub>50</sub> e Teste de Tukey para redução do DPPH

Amostra	Média IC <sub>50</sub> (µg) ± SD	Resultado do Teste de Tukey
Vitamina C	4,28 ± 0,03	a <sup>1</sup>
Rutina	6,65 ± 0,03	a <sup>2</sup>
Fração Metanol (FM)	339,81 ± 0,66	a <sup>3</sup>
Fração Acetato de etila (FAC)	395,05 ± 0,60	a <sup>4</sup>
Fração Clorofórmica (FCL)	>500	
Fração Hexânica (FH)	>500	

(\*) – Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente

Bocco *et al.* (1998) demonstraram a potente atividade antioxidante do extrato metanólico de sementes de *Citrus*. O estudo de Luzia e Jorge (2009) comprovou que a utilização do extrato metanólico de sementes de limão agregado à antioxidantes



sintéticos teve uma boa atividade antioxidante, podendo substituir o sintético parcialmente pelo antioxidante natural.

Estas pesquisas citadas acima corroboram os resultados encontrados na presente pesquisa.

#### 5.10 ENSAIO *in vitro* DA ATIVIDADE DA ENZIMA TIROSINASE

São muito utilizados em produtos farmacêuticos e cosméticos os inibidores e estimuladores da enzima tirosinase com o objetivo de diminuir a produção excessiva de melanina nas camadas epidérmicas ou estimular a produção com o propósito de utilizar em doenças de hipopigmentação, como por exemplo, o vitiligo (CANSIAN, 2010).

Hiperpigmentações ou hipopigmentação cutâneas são problemas dermatológicos relacionados à pigmentação. Existe intensa pesquisa relacionada a estes distúrbios e de ativos seguros e eficazes que podem ser utilizados em produtos cosméticos e farmacêuticos. A identificação de inibidores de enzima envolvida na melanogênese, como o ácido kójico, é extremamente importante (MACRINI, 2004).

Vários são os estudos relacionados as frutas cítricas em relação a enzima tirosinase. Um inibidor da tirosinase foi isolado da casca de frutas cítricas identificadas como a nobiletina. Nobiletina ( $IC_{50}$  ; 46,2 mM) apresentou maior potência em relação o ácido kójico ( $IC_{50}$ ; 77,4 mM), utilizado como controle positivo, e foi encontrado atividade potencialmente eficaz de inibir a produção de melanina (SASAKI, YOSHIZAKI, 2002)

De acordo com Matsuura, Ukeda, Sawamura (2006) os óleos essenciais cítricos possuem a capacidade de inibir a atividade da enzima tirosinase.

Outra estudo em relação a tirosinase foi realizado Ohguchi, Akao, Nozawa (2006), onde demonstrou que a Naringenina, uma flavanona, encontrada nos *Citrus* possui a capacidade de aumentar a atividade da tirosinase.

O extrato etanólico do fruto verde de *Citrus hassaku* apresentou atividade inibitória da tirosinase significativa, atribuída pela a naringina (ITOH *et al.*, 2009), substância encontrada nas sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck .

No presente estudo o efeito da tirosinase das quatro frações obtidos da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck foram avaliadas pelo método de espectrofotometria. O ácido kójico foi escolhido como um controle positivo, devido a capacidade de inibir de forma eficaz a tirosinase. A FC demonstrou resultados estatísticos significativos por exibir atividade de estimulação a tirosinase na concentração de 300 µg/mL, em comparação com os controles, conforme mostra na Figura 32.

Em concentrações de 100 µg/mL ou 1000 µg/mL da FCL não foi observada interferência da fração sobre a atividade tirosinase. Isto pode ocorrer devido a outras substâncias presente na fração, ou outros mecanismos de ação que podem estar envolvidos no estímulo ou não da melanogênese.

Como o estímulo da enzima resulta na maior formação de dopaquinona, a leitura (mDO) aumenta proporcionalmente.

Este resultado nos remete a possibilidade de prosseguir os estudos para realizar ensaios com células *in vitro*, para comprovação da utilização da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em doenças de hipopigmentação, pois esta análise serve apenas como guia para avaliação da influência sobre a enzima tirosinase.

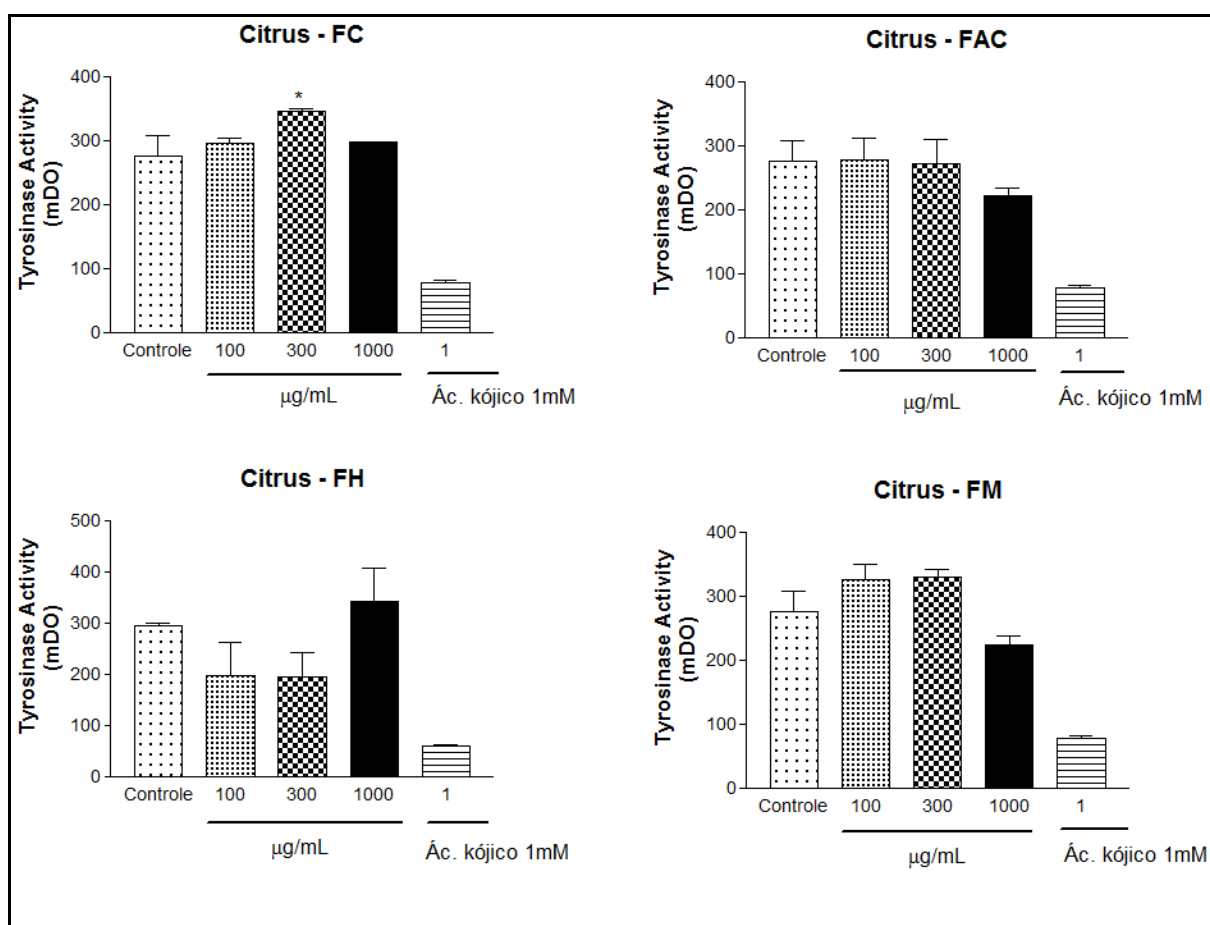


Figura 32 – Resultados das Frações FC, FAC, FH e FM frente à Enzima Tirosinase

### 5.11 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Foram submetidas a esta avaliação amostras das FH, FM, FAC e FC. Conforme os resultados que estão demonstrados na Tabela 15, pode-se observar que entre as amostras testadas apenas a FM possui uma toxicidade significativa frente a este crustáceo, pois 172,78 µg/mL foram capazes de provocar a mortalidade de 50% das larvas. Este resultado também sugere uma considerável bioatividade frente à *Artemia salina*, pois segundo Meyer *et al.* (1982), extratos com valores de  $CL_{50}$  inferiores a 1000 µg/mL são considerados bioativos.

As frações FAC, FH e FC não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina*, pois os valores de  $CL_{50}$  foram maiores que 1000 µg/mL.

Para o cálculo da  $CL_{50}$  os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probitos.

Os solventes utilizados foram metanol para FM e FAC e hexano para fração FC e FH. Os solventes não demonstraram toxicidade frente à *Artemia salina*. Já o controle positivo sulfato de quinidina apresentou  $CL_{50}$  50,12  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 15 – Mortalidade de *Artemia salina* e estimativa de  $CL_{50}$

Amostra	10 ( $\mu\text{g/mL}$ )	100 ( $\mu\text{g/mL}$ )	1000 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CL_{50}$	Intervalo de confiança 95%
FH	0	0	0	>1000	-
FC	0	0	0	>1000	-
FAC	0	1	0	>1000	-
FM	3	11	25	172,78	87,73-340,29
Sulfato de quinidina	16	10	18	50,12	35,80-70,16

Nota : A = amostra,  $CL_{50}$  = concentração média letal

## 5.12 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE PRELIMINAR DAS SEMENTES DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck POR MEIO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Os resultados da avaliação da atividade hemolítica das sementes de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, aplicada com o objetivo de verificar a eventual hemólise produzida pelas frações, em meio de ágar sangue, confirmaram o resultado negativo na reação. Observa-se que para o teste de difusão em discos não se formaram halos de hemólise para os padrões dos solventes utilizados e com relação às frações, não representando atividade hemolítica de acordo com a Figura 33 (a).

O resultado negativo no ensaio de atividade hemolítica indica não toxicidade nesse modelo, no entanto outros estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para que se possa avaliar a toxicidade dessa espécie.

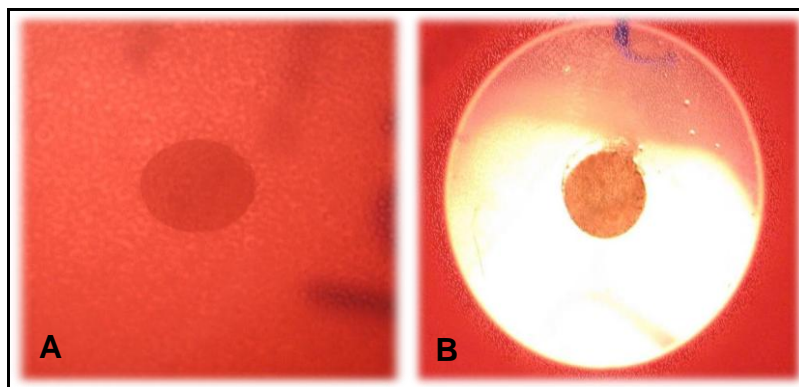


Figura 33 – Resultados atividade hemolítica [A] resultado negativo, frações [B] controle positivo, Saponina

### 5.13 BIOENSAIOS DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

A alelopatia é um fenômeno químico-ecológico no qual metabólitos secundários produzidos por uma espécie são liberados e interferem na germinação e/ou no desenvolvimento de outras plantas num mesmo ambiente. Num sentido amplo, os efeitos alelopáticos se referem tanto na inibição quanto ao estímulo de desenvolvimento de outros organismos (RICE, 1984).

Os aleloquímicos pertencem a diferentes categorias de compostos, tais como fenóis, terpenos, alcalóides, poliacetilenos, ácidos graxos, peptídeos, entre outros (PERIOTTO, PEREZ, LIMA, 2004; MIRÓ, FERREIRA, ÁQUILA, 1998). Estes afetam de várias maneiras o organismo que será atingido tais como: redução na absorção de nutrientes, alteração nos hormônios de crescimento, inibição da fotossíntese, alterações no processo respiratório acelerando ou diminuindo a respiração, efeitos na síntese de proteínas, alterações na permeabilidade da membrana e inibição da atividade enzimática (MAULI *et al.*, 2009).

Essas substâncias químicas estão presentes em diferentes órgãos, incluindo folhas, flores, frutos e gemas de muitas espécies vegetais (PERIOTTO, PEREZ, LIMA, 2004; DELACHIAVE *et al.*, 1999; MIRÓ, FERREIRA, ÁQUILA, 1998).

Souza Filho (2002) pesquisou os extratos hidroalcoólicos e extratos brutos de várias partes da planta incluindo as sementes de *Canavalia ensiformis* e comprovou os efeitos alelopáticos sobre a germinação de sementes e sobre o

alongamento da radícula das plantas daninhas *Mimosa pudica*, *Urena lobata*, *Senna obtusifolia*, *Senna occidentalis*.

Visto que o presente trabalho também objetivou a redução da poluição ambiental gerado pelos resíduos agroindustriais dispostos incorretamente no meio ambiente, a inclusão do estudo alelopático da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck é de suma importância na tentativa de reduzir o uso excessivo de produtos prejudiciais ao meio ambiente, agricultor e consumidor, por meio de produtos naturais para controle de espécies invasoras.

#### 5.13.1 Teste de germinação e crescimento

Em relação aos bioensaios de germinação e crescimento a análise dos efeitos alelopáticos das frações de (L.) Osbeck indicaram que a intensidade dos efeitos variou em função das frações avaliadas e das concentrações utilizadas como indicadora. Nos resultados da velocidade de germinação, foi verificado que todas as frações atrasaram a velocidade de germinação e causaram redução na germinabilidade de alface, sendo que as frações FCL e FM nas concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L, causaram atraso na germinação, com valores superiores a 50%, sendo estes de  $\pm 55\%$  e  $\pm 70\%$  para as frações clorofórmica e metanólica, na maior concentração ensaiada. Para a germinação, foi verificado que a fração hexânica foi quem mais inibiu a porcentagem final de sementes germinadas, causando reduções de 53,5% para a maior concentração ensaiada, quando comparada ao controle (Tabela 16).

Tabela 16 – Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação (G%) de alface submetidas a diferentes concentrações da fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL), fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Índice de Velocidade de Germinação (IVG)			
Tratamento	250 mg/L	500mg/L	1000mg/L
Controle: 24,54 ± (0,41)			
FH	16,20 ± (0,73)*	12,50 ± (0,62)*	16,60 ± (0,17)*
FCL	15,94 ± (0,49)*	14,2 ± (0,51)*	10,8 ± (0,71)*
FM	13,96 ± (0,40)*	10,47 ± (0,15)*	7,19 ± (0,25)*

Porcentagem de Germinação (% G)			
Tratamento	250 mg/L	500 mg/L	1000 mg/L
Controle: 99,5 (1,00)			
FH	86,5 ± (3,00)*	74,5 ± (3,00)*	46,5 ± (1,15)*
FCL	79,5 ± (1,91)*	75,0 ± (2,58)*	52,5 ± (4,72)*
FM	93,5 ± (2,51)*	80,5 ± (1,00)*	83,0 ± (1,91)*

\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey. <sup>ns</sup>A média do tratamento não difere significativamente da média do controle.

Com relação ao crescimento, foi verificado que todas as frações causaram redução no tamanho das plântulas, nas maiores concentrações ensaiadas (Figura 34 e 35). No crescimento da raiz primária e hipocótilo, sendo os efeitos mais acentuados observados na FM,  $\pm 50$  e  $55 \pm \%$  para raiz primária e  $\pm 19\%$ , e  $\pm 33\%$  para o hipocótilo, nas concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L, em relação ao controle. No teor de massa seca, foi observado que não houve reduções significativas em nenhuma das frações ensaiadas, indicando que as frações avaliadas, não causaram redução na biomassa vegetal da espécie em estudo (Figura 35).

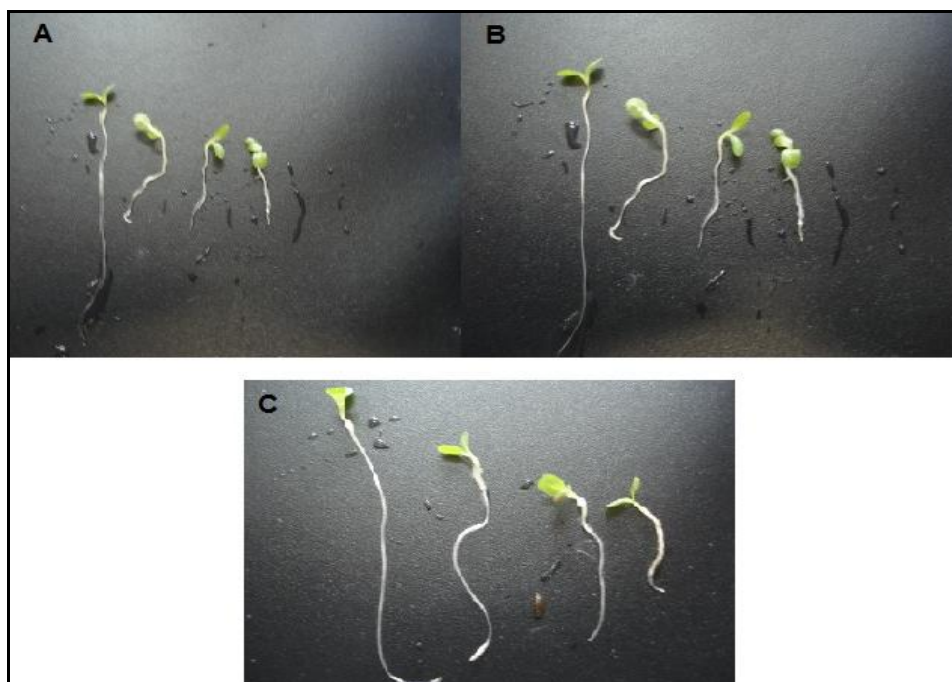


Figura 34 – Plântulas submetidas as (A) fração hexânica (FH), (B) fração clorofórmica (FCL) e (C) fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, indicando alterações no comprimento de plântulas (hipocótilo e radícula)



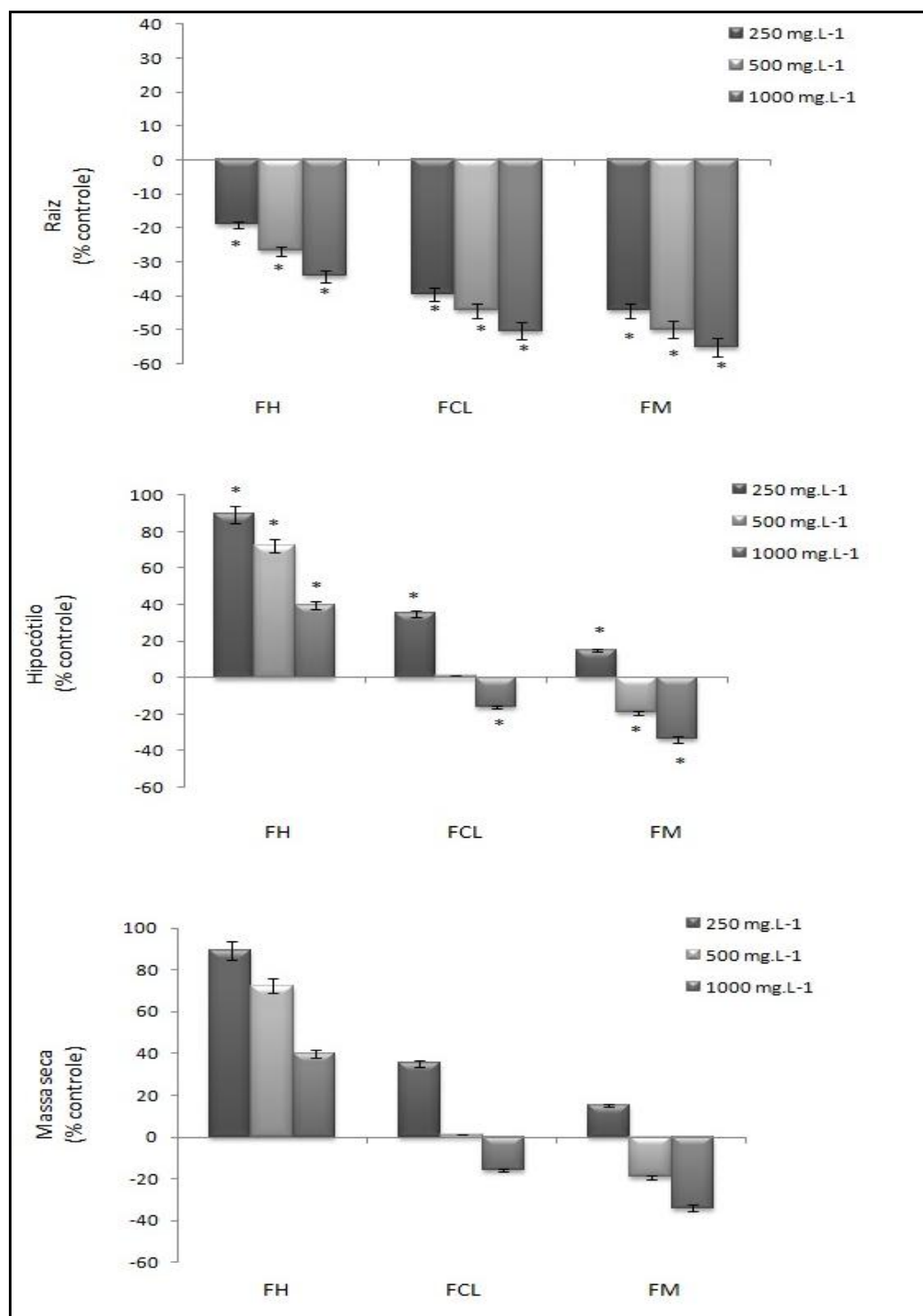


Figura 35 – Crescimento médio da raiz e hipocótilo e massa seca de plântulas de alface submetidas à fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL) e fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dados expressos em percentual em relação ao controle.

\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Em relação pesquisas de *Citrus* relacionadas à alelopatia foram estudados os resíduos de *Citrus junos* que inibiram crescimento das raízes e brotos de alfafa (*Medicago sativa* L.), agrião (*Lepidium sativum* L.), capim-colchão (*Digitaria sanguinalis* L.), alface (*Lactuca sativa* L.), Timothy (*Pheleum pratense* L.) e azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) (KATO-NOGUCHI, TANAKA, 2004). Resultados sugerem que resíduos *C. junos* pode possuir potencial efeito alelopático, podendo ser potencialmente útil para manejo de plantas daninhas.

Foi observada a não existência de plantas próximas das plantações de *Citrus aurantium* devido principalmente a mecanismos alelopáticos. Foram isoladas algumas substâncias que reduziram a germinação de sementes e crescimento das plântulas de *Amaranthus retroflexus* (ALSAADAWI, ARIF, ALRUBEAA, 1985).

Com relação às alterações morfológicas, foi verificado que todas as frações causaram redução em alguns parâmetros avaliados como aumento ou redução de pêlos na zona pilífera, ou oxidação na região da coifa. Foi observado que a concentração de 1000 mg/L da FH e FCL (Figura 36 A e G) causou formação de raiz secundária e calo meristemático na região da zona pilífera, sendo que este processo pode estar associado a um aumento na síntese de etileno pela raiz primária, ocasionando alterações no padrão morfológico (TAIZ, ZEIGER, 2004). A concentração de 250 mg/L FM (Figura 36 H), causou aumento de pêlos na zona pilífera, podendo estar relacionada a uma deficiência na absorção de água pela plântula, causando aumento dos pêlos servindo como um mecanismo para melhorar a absorção (LARCHER, 2000).

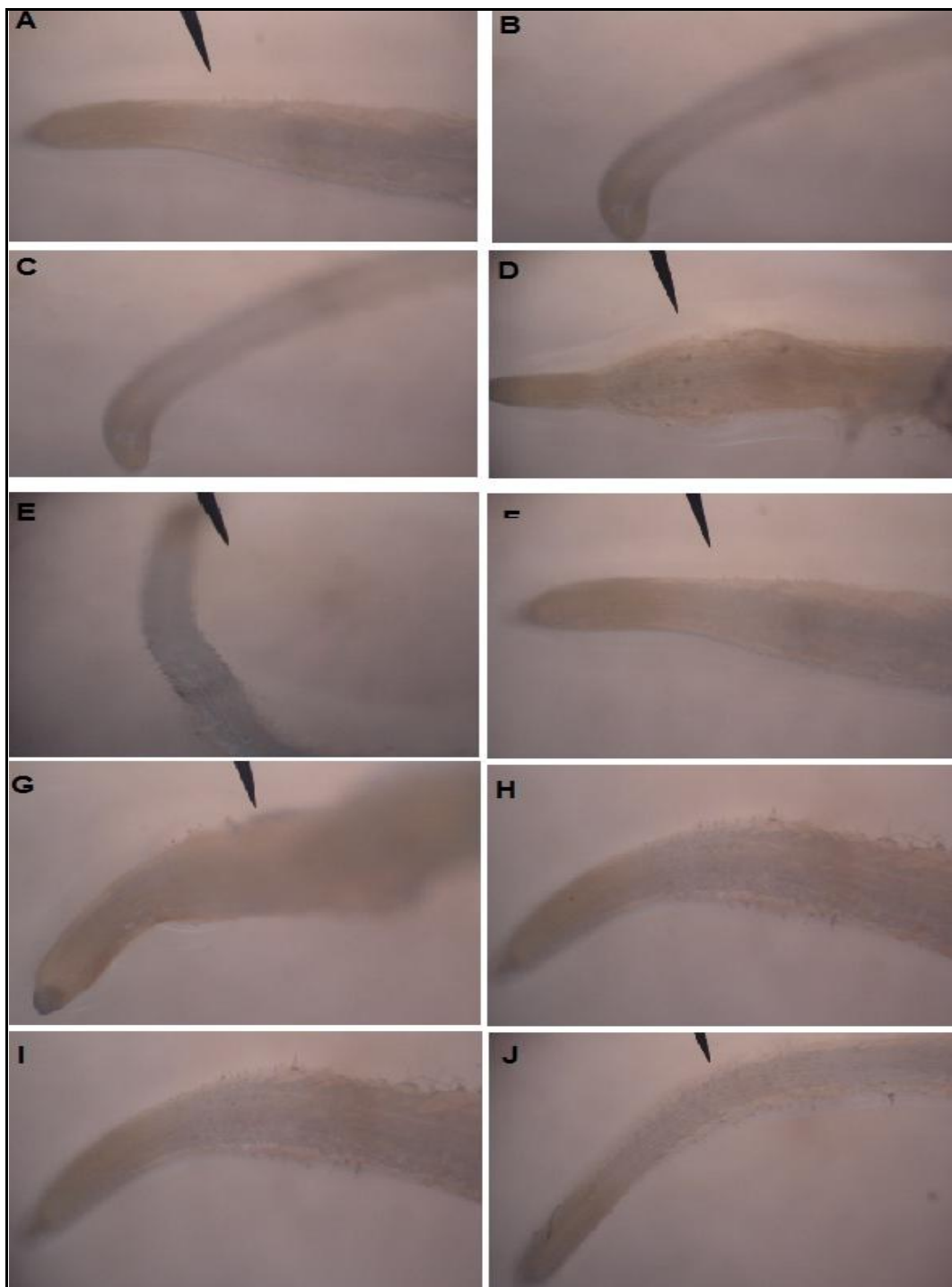


Figura 36 – Alterações nos padrões morfológicos da região meristemática (zona pilífera e coifa) de plântulas de lactuca sativa, submetidas ao (A) controle com água destilada, fração hexânica (B,C,D), fração clorofórmica (E,F,G) e fração metanólica (H,I,J) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

### 5.13.2 Análise do índice mitótico

No parâmetro divisão celular, foi observado que com o aumento da concentração das frações, causou redução no processo de divisão das células, sendo o maior efeito depressivo verificado na concentração de 1000 mg/L, para todas as frações avaliadas. Os resultados das observações citológicas em células meristemáticas das raízes de plântulas de alface, tratadas com diferentes concentrações das frações de *Citrus*, são apresentadas na Figura 37.

Com o aumento da concentração das frações avaliadas, o valor do índice mitótico foi continuamente reduzido (Figura 37), sendo o maior efeito depressivo verificado na concentração de 1000 mg/L em que o índice mitótico atingiu inibição de  $\pm 69\%$  para a FM, quando comparado ao controle. Comparando-se as freqüências das diferentes fases da mitose dentro de cada tratamento, foi observada maior freqüência de prófase e menor freqüência das outras fases subsequentes. Com o aumento da concentração das frações, houve uma drástica redução no índice mitótico, com paralisação do crescimento radicular a partir da concentração de 500 mg/L, em consequência principalmente da ausência de telófase. Essa interferência na divisão celular causada pela ação do extrato com acentuado efeito sobre a morfologia do sistema radicular (Figura 37) provavelmente representa um dos mecanismos de ação do extrato sobre o desenvolvimento da planta-teste.

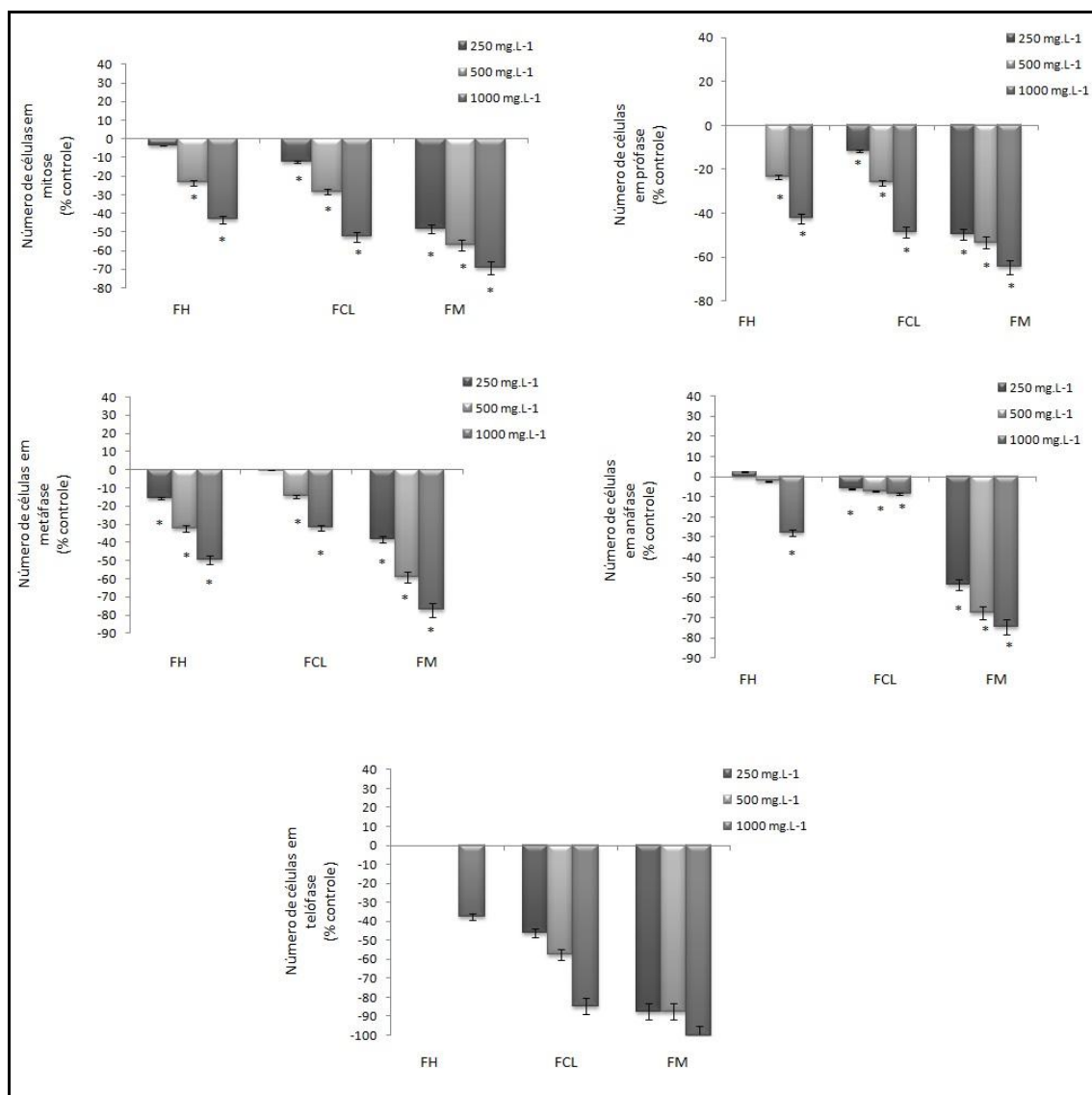


Figura 37 – Índice mitótico em células meristemáticas de raízes de plântulas de alfaca, expostas a diferentes concentrações da fração hexânica (FH), clorofórmica (FCL) e metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dados expressos em percentual em relação ao controle

\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

### 5.13.3 Análise da Atividade da peroxidase, catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, polifenoloxidase, $\alpha$ -amilase e proteínas totais.

A atividade das enzimas peroxidase e catalase foi acentuada em todas as concentrações das frações utilizadas, tendo um aumento da atividade enzimática

nas concentrações mais elevadas. No entanto, na análise da atividade da peroxidase, as plântulas de alface foram mais sensíveis às frações metanólica e clorofórmica, nas maiores concentrações ensaiadas, com aumento de  $\pm 13$  e  $\pm 15\%$ , sugerindo uma possível relação de causa e efeito. Já na atividade da enzima catalase a fração clorofórmica apresentou maior desempenho em relação às demais, com um aumento de  $\pm 20\%$  para a concentração de 1000 mg/L (Figura 38). Com relação à atividade da ascorbato peroxidase foi verificado um aumento acentuado da atividade enzimática em todas as frações ensaiadas, não sendo significativo apenas para a concentração de 250 mg/L da FH. A FM causou efeito mais acentuado na atividade desta enzima, com aumento de  $\pm 34$  UEA. mg. MF e  $\pm 39$  UEA. mg. MF para as concentrações de 500 mg/L e 1000 mg/L em relação ao controle. A SOD apresentou aumento acentuado, onde a FCL e FM causaram um aumento de  $\pm 9$  UEA. mg. MF para ambas as frações na concentração de 1000 mg/L. A POL aumentou de acordo com a concentração das frações utilizadas, existindo uma relação dose-dependência entre as frações e concentrações avaliadas. A FCL e FM na concentração de 1000 mg/L, causaram estímulo de 63 UEA. mg. MF e 74 UEA. mg. MF, sendo estatisticamente significativo quando comparado ao controle (Figura 38). Com relação ao gasto energético ( $\alpha$ -amilase), foi observado aumento na produção enzimática, em todas as frações e na maioria das concentrações ensaiadas, em comparação ao controle, sendo que a fração metanol não apresentou atividade na menor concentração. O processo de germinação de sementes leva a desencadeamentos enzimáticos capazes de desdobrarem reservas nutritivas com a finalidade de nutrição do eixo embrionário. Dentre as reservas está o amido e entre as enzimas hidrolíticas a  $\alpha$ -amilase (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). No teor de proteínas, foi observado um aumento acentuado, em todas as frações avaliadas. Apenas a concentração de 500 mg/L da FH não causou aumento significativo em relação controle. Todas as concentrações da FCL e FM provocaram aumento no nível de proteínas totais, sendo que a concentração de 1000 mg/L da FCL e FM provocaram aumento de 222 e 234 UEA. mg. MF, existindo uma relação com o alto nível das enzimas avaliadas (Figura 39).

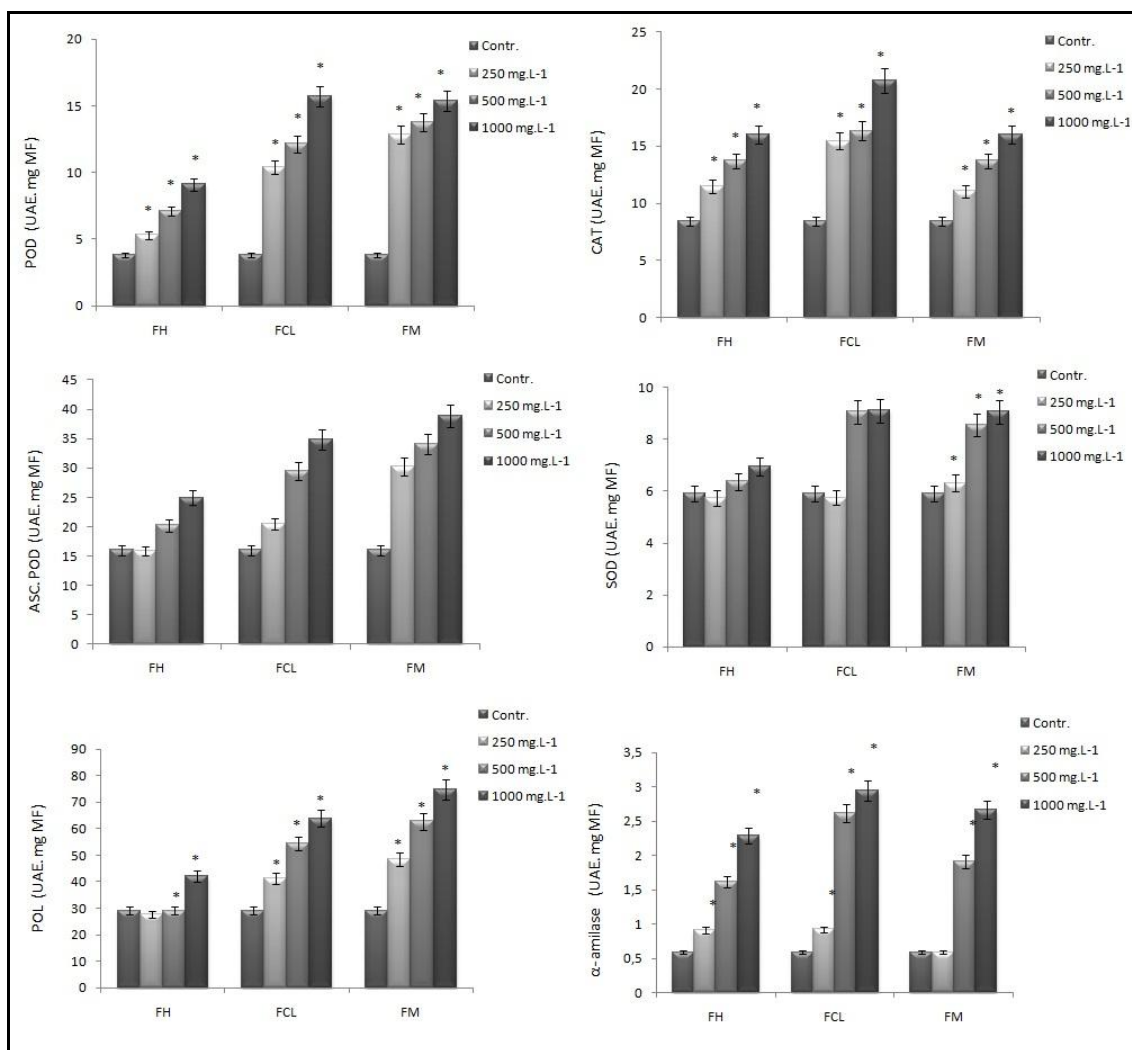
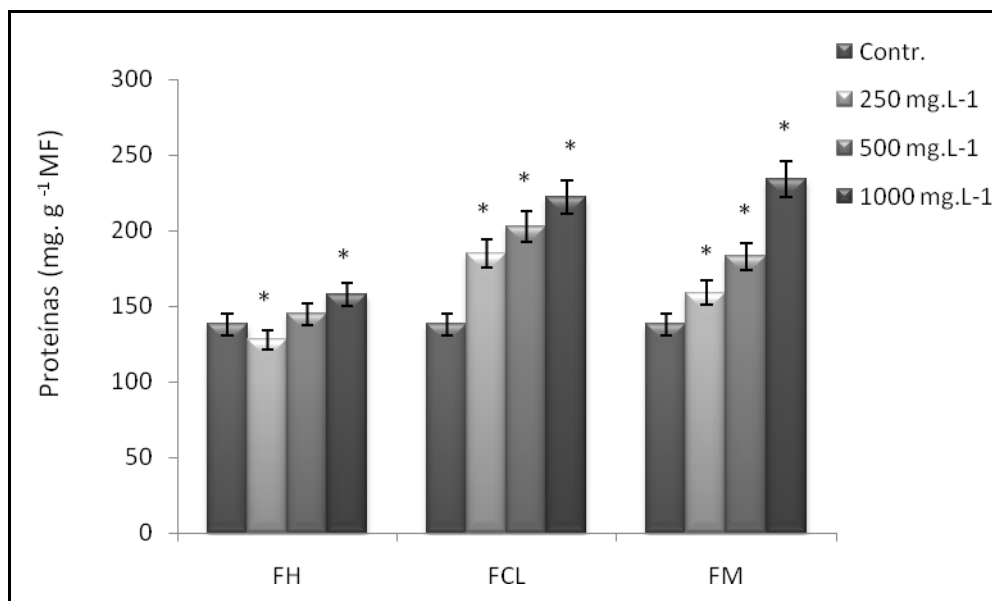


Figura 38 – Atividade da peroxidase e catalase, ascorbato peroxidase, superóxido dismutase, polifenoloxidase e  $\alpha$ -amilase, em plântulas de alface submetidas à fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL) e fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dados expressos em percentual em relação ao controle

\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.



\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Figura 39 – Teor de proteínas totais, em plântulas de alface submetidas à fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL) e fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dados expressos em percentual em relação ao controle.

#### 5.13.4 Análise do teor de clorofila e respiração

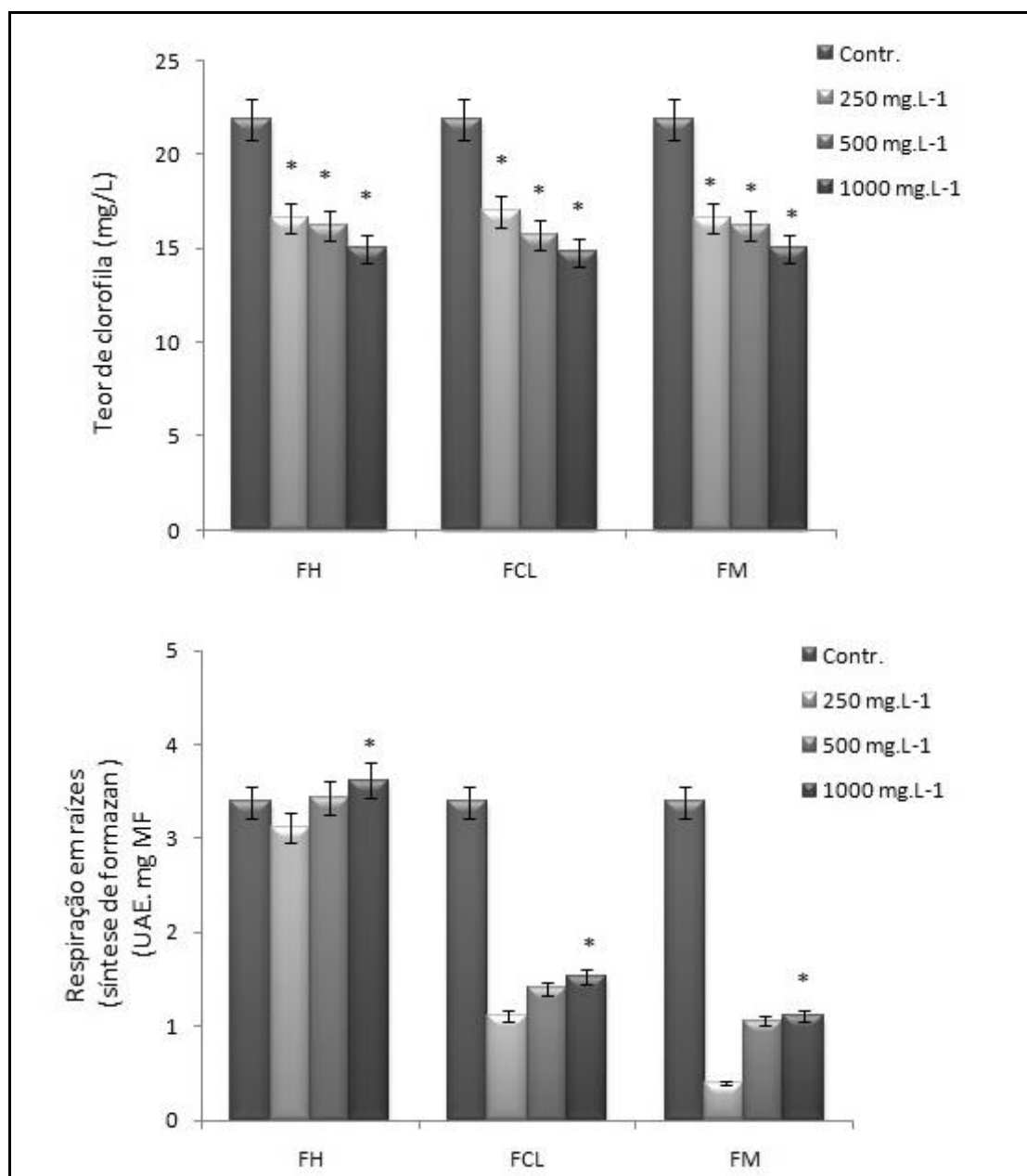
Com relação ao teor de clorofila, foi observado que as frações clorofórmica e metanólica causaram redução significativa no teor de clorofila em alface, em todas as concentrações avaliadas. As maiores concentrações reduziram a clorofila das folhas em estudo, causando diminuição da atividade fotossintética, com redução de  $\pm 14$  mg/L e  $\pm 15$  mg/L na concentração de 1000 mg/L, respectivamente.

Em relação à respiração em raízes foi observado que as FCL e FM foram as que mais causaram redução no processo de respiração apenas na concentração de 1000 mg/L, com reduções de 1,524 e 1,116 UEA. mg. MF. A FH apresentou aumento da respiração em raízes na maior concentração, quando comparados ao controle (Figura 40).

Vários autores têm reportado que algumas classes de aleloquímicos inibem a fotossíntese por induzir mudanças no conteúdo de clorofila das plantas receptoras (CHOU, 1999; BAZIRAMAKENGA, SIMARD, LEROUX, 1994; BLUM, REBBECK, 1989; EINHELLIG, RASMUSSEN, 1979; EINHELLIG, KUAN, 1971). A aparência



clorótica das plantas seria um sintoma da degradação das moléculas de clorofila ou da inibição da sua síntese, ambos os efeitos mediados por aleloquímicos, que impedem a formação das Mg-porfirinas (EINHELLIG, 1986). Em ambos os casos, esses efeitos lembram a atuação dos herbicidas, como as piridazinonas e imidazolinonas (CAYON *et al.*, 1990; DUKE, 1985).



\*A média do tratamento difere significativamente ( $p < 0,05$ ) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

Figura 40 – Teor de clorofila e respiração em raízes de plântulas de alface submetidas à fração hexânica (FH), fração clorofórmica (FCL) e fração metanólica (FM) de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. Dados expressos em percentual em relação ao controle.

#### 5.14 OBTENÇÃO DAS EMULSÕES FORMULADAS COM ÓLEO DA SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

As emulsões foram obtidas com sucesso após a seleção cautelosa das matérias-primas, com objetivo de comparar as formulações e avaliar a melhor formulação para incorporar o óleo de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e não a funcionalidade do óleo em sistemas emulsivos, pois a avaliação da emoliência do óleo seria impossível, devido a associações de emolientes contido nas matérias primas propostas. Optou-se por matérias-primas composta por associação de componentes para reduzir o estoque de matérias-primas, custo interno de logística, redução no custo de descartes de embalagens, assim como redução no custo do controle de qualidade em razão da unificação de lotes. Também se optou por duas formulações onde o processo foi realizado a frio com objetivo de facilitar o preparo das emulsões e diminuir os custos energéticos na indústria cosmética.

Com o objetivo de obter um produto emulsionado estável no tempo necessário, foram selecionados tensoativos que supria os critérios desejados nas formulações. A concentração do tensoativo influencia na viscosidade da emulsão sendo essencial na qualidade de estabilidade do produto. A escolha dos óleos também é um fator relevante por possuírem características como espalhabilidade, absorção, viscosidade, sensação lubrificante e toque na pele. Assim, neste trabalho procurou-se desenvolver emulsões O/A com fase oleosa composta por óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck com obtenção de emulsões estáveis utilizando conjunto de tensoativos a 3,5%.

Dentre as formulações apenas a formulação nº 2 descrita no Quadro 5 houve a necessidade de aumentar a viscosidade da fase externa e interna, promovendo maior estabilidade da formulação, optou-se por Carbopol ultrez 21 (Acrylates/C10-30 Alkyl Acrylate Crosspolymer) um polímero, e o álcool cetílico um álcool graxo, adequado para a finalidade. Para estabilizar a emulsão foi necessária a utilização de uma concentração maior de agentes emulsificantes, pois isso resulta num filme ao redor das gotículas de óleo mais firme e compacto reduzindo a coalescência. Os álcoois graxos espessam emulsões pela formação de estrutura em gel que se prolonga da superfície das gotículas para a fase externa. Isso aumenta a viscosidade e impede o movimento das gotículas (MORAIS, 2006).

Os procedimentos de manipulação, como energia de agitação, tempo de homogeneização e temperatura de preparação, foram padronizados para melhor qualidade e estabilidade das emulsões. A forma de preparo de uma formulação pode influenciar no tamanho e homogeneidade das partículas, afetar estabilidade e as características finais do produto.

De acordo com Moraes (2006) o aumento da velocidade de agitação ou da concentração de tensoativo diminui o tamanho das partículas da fase oleosa e assim aumenta a viscosidade da emulsão, bem como sua estabilidade.

As formulações foram preparadas de acordo com a metodologia descrita neste trabalho e a caracterização da formulação desenvolvida foi realizada vinte quatro horas após o preparo. Foram caracterizadas através da análise macroscópica e organoléptica, avaliação de homogeneidade por microscopia, determinação do tipo de emulsão, teste de espalhabilidade. Posteriormente foram realizados testes preliminares de estabilidade: centrifugação, estresse térmico, determinação do valor de pH. Também foram realizados os testes de estabilidade acelerada: ciclo gela degela e avaliação macroscópica, densidade, viscosidade, pH nas seguintes condições: temperatura ambiente, 45°C e exposição ao UV. Análises sensoriais foram feitas para comparar as formulações e com a formulação escolhida pelos voluntários foi realizada a análise de irritabilidade.

As emulsões foram formuladas de acordo com o Quadro 5.

Quadro 5 – Formulações com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Matérias Primas	Concentração das matérias-primas % (p/p)		
	Form. nº 1	Form. nº 2	Form. nº 3
<b>Hostacerin SAF<sup>®</sup></b>	3,5	-	-
<b>Olivem 1000<sup>®</sup></b>	-	3,50	-
<b>RM 2051<sup>®</sup></b>	-	-	3,5
<b>Carbômero</b>	-	0,20	-
<b>Álcool Cetílico</b>	-	1,00	-
<b>BHT</b>	0,05	0,05	0,05
<b>Trietanolamina</b>	-	q.s pH 5,7-6,7	-
<b>Glicerina</b>	3,00	3,00	3,00
<b>Fenoxietanol e parabenos</b>	0,60	0,60	0,60
<b>Óleo de semente de <i>C. sinensis</i></b>	2,00	2,00	2,00
<b>EDTA-NA</b>	0,05	0,05	0,05
<b>Água deionizada qsp</b>	100,00	100,00	100,00

#### 5.14.1 Caracterização da formulação desenvolvida

##### 5.14.1.1 Análise macroscópica e organoléptica

A análise macroscópica das formulações mostrou que todas apresentaram-se visualmente estáveis. As formulações possuíam coloração branca, aspecto de creme, com odor característico das bases. A formulação nº3 apresentou menor consistência em relação às demais.

##### 5.14.1.2 Avaliação de homogeneidade das emulsões por microscopia óptica

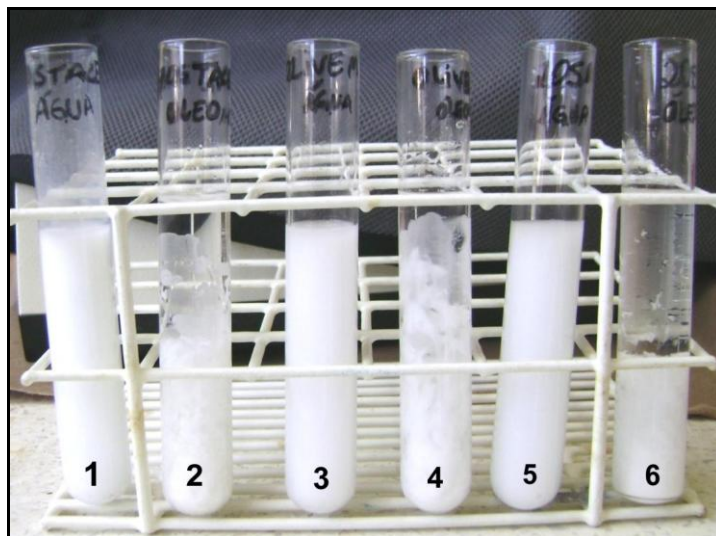
As formulações de nº 1, 2, 3 apresentaram glóbulos bem distribuídos e de tamanho uniforme quando analisadas por microscopia óptica em aumento de 40 vezes. Estes parâmetros são indicativos de não coalescência, homogeneidade e estabilidade dos produtos emulsionados. A Figura 41 seguinte mostra o aspecto de cada emulsão, visualizado em microscópio óptico com aumento de 40X com adição de corante para melhor visualização.



Figura 41 – Visualização das emulsões formuladas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em microscópio óptico com aumento de 40X.

#### 5.14.1.3 Determinação do tipo de emulsão

De acordo com a Figura 42 as formulações foram classificadas como emulsão do tipo O/A. As três formulações solubilizaram facilmente em água e dificilmente em óleo mineral.



Nota: (1) formulação nº 1 com água; (2) formulação nº 1 com óleo mineral; (3) Formulação nº 2 com água; (4) Formulação nº 2 com óleo mineral; (5) Formulação nº 3 com água; (6) Formulação nº 3 com óleo mineral.

Figura 42 – Teste para determinação do tipo de emulsão das três formulações estudadas

Fonte: A autora, 2010

#### 5.14.1.4 Teste de espalhabilidade *in vitro* das emulsões formuladas com óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Buscou-se complementar os restantes dos testes com o teste de espalhabilidade *in vitro*. Este teste permitiu averiguar o desempenho da espalhabilidade das emulsões formuladas com o óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. O resultado denota que as três formulações apresentam espalhamento a partir de uma extrusão e por isso potencial para o uso em dermoformulações.

O resultado da espalhabilidade *in vitro* das emulsões evidencia que a emulsão nº 2 tende a espalhar melhor com um resultado de 5.671,62mm<sup>2</sup>, acredita-se que seja pela influência do álcool cetílico e do carbômero. A formulação nº 3

obteve resultado  $4.474,69\text{mm}^2$  e a formulação que apresentou menor espalhabilidade foi a formulação nº 1 com  $4.126,15\text{mm}^2$  (Figura 43).



Figura 43 – Teste de espalhabilidade das formulações

Fonte: A autora, 2010

#### 5.14.2 Estabilidade

Na área cosmética é de suma importância o produto possuir eficácia, segurança e principalmente uma boa aceitação pelo consumidor. Diante disto as emulsões são muito utilizadas em produtos cosméticos, pois possuem a qualidade de apresentar uma boa aceitação pelo consumidor. Porém esses sistemas apresentam também desvantagens como instabilidade física, sendo a estabilidade o aspecto fundamental na avaliação da validade do produto.

Uma emulsão estável é aquela que mantém a qualidade de fase oleosa dispersa na fase contínua, ou vice-versa, mesmo quando é submetida a tensões decorrentes de temperatura, agitação e gravidade (MORAIS, 2006). Desta forma, estabilidade é a capacidade que o produto possui num determinado período de tempo, do início ao final de sua vida útil, e em determinada embalagem, de manter as mesmas propriedades e características que tinha no momento em que finalizou a sua fabricação, por meio de um procedimento padronizado (D'LEÓN, 2001). Assim sendo, neste trabalho, utilizou-se o Guia de Estabilidade para Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004) como literatura base para realização dos ensaios de estabilidade física.

Como as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, podem apresentar instabilidade de diferentes maneiras sob a forma de cremeação (com ou sem agregação e aumento do tamanho da partícula), floculação (com ou sem cremeação), aumento do diâmetro da partícula (diminuição da área interfacial) e coalescência, resultando em fases separadas (RIEGER, 1996).

Todas as formulações para dar continuidade ao estudo foram submetidas aos Testes de Estabilidade Preliminares, vinte e quatro horas após a manipulação e posteriormente foram realizados os testes de estabilidade acelerada. Emulsões recém-preparadas não devem ser submetidas a testes de estabilidade, a dispersão pode não ter adquirido estabilidade logo após o preparo. É desejável um período inicial de 24 a 48 horas após o preparo para que haja a estabilização da formulação (MASSON, 2005; RIEGER, 1996).

#### 5.14.2.1 Testes preliminares de estabilidade

Os dados dos estudos de estabilidade preliminar devem ser analisados pelo conjunto de resultados obtidos nos diversos testes. Os estudos de estabilidade preliminar consistem na realização dos testes da fase inicial do desenvolvimento do produto, utilizando diferentes formulações com durações reduzidas. Empregam-se condições extremas de temperatura com objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais, que devem ser observados e analisados conforme as características de cada tipo de produto. Pelas condições em que é conduzido, o estudo não tem finalidade de estimar a vida útil do produto, mas auxiliar a triagem das formulações (BRASIL, 2004).

Foram utilizadas análise macroscópica, organoléptica e centrifugação para uma pré seleção da formulação, por serem métodos rápidos. Através da análise macroscópica pode-se observar a aparência da emulsão e verificar se houve ou não separação de fases, detectando a se a emulsão apresenta-se estável. As três emulsões desenvolvidas não apresentaram alterações macroscópicas ou organolépticas.

Com a centrifugação pode-se também avaliar a estabilidade de diferentes emulsões, avaliando a coalescência ou a cremação (MORAIS, 2006; AZZINI, 1999). Este teste tem por finalidade aumentar abruptamente a força de gravidade, aumentando a movimentação das partículas, e gerar condição favorável para se observar uma possível instabilidade (BRASIL, 2004). As formulações desenvolvidas não apresentaram separação de fases frente ao teste de centrifugação, sendo todas consideradas estáveis e assim, submetidas ao teste de estabilidade acelerado.

Os valores de pH obtidos para as formulações estudadas encontram-se na Tabela 17, onde pode-se observar que praticamente todas as formulações apresentaram pH levemente ácido, na faixa de 6,18 a 6,56. Entretanto, apresentaram valores de pH compatível com o pH cutâneo, pois quando aplicamos à pele algum produto que possua valor diferente de pH, alteramos as condições fisiológicas desse órgão, expondo-o a uma situação adversa (AZZINI, 1999).

Tabela 17 – Valores do pH das formulações estudadas, acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.

Formulação	F1	F2	F3
PH	6,48	6,18	6,56

Neste estudo também se utilizou o teste de estresse térmico proposto por Braconi *et al.* (1995), que emprega a temperatura como condição de tensão sobre a formulação e pode ser considerado um teste de realização rápida.

De acordo com Ferrari (2002), as emulsões que não apresentam modificações após o teste de estresse térmico são potencialmente estáveis.

Neste teste, as formulações foram submetidas ao ciclo de aumento de temperatura gradual por um período de tempo determinado. A cada elevação da temperatura, a análise macroscópica das formulações foi realizada a fim de acompanhar o surgimento de instabilidades físicas como gotas ou uma camada de óleo e separação de fase. De acordo com a Figura 44 as formulações submetidas a este teste não apresentaram modificações.





Nota: (1) Formulação nº 1; (2) Formulação nº2;  
(3) Formulação nº3

Figura 44 – Visualização das emulsões  
após análise de estresse térmico

Fonte: A autora, 2010

#### 5.14.2.2 Estudo de estabilidade acelerada das emulsões

As emulsões analisadas pelos testes preliminares de estabilidade foram submetidas aos Testes de Estabilidade Acelerada. Normalmente, para a realização destes testes empregam-se condições agressivas de temperatura. Essas condições extremas aceleram os processos instabilidade, reduzindo o tempo para avaliação da estabilidade (MORAIS, 2006; MASSON, 2005; FERRARI, 1998). Os testes de estabilidade são realizados nas formulações devido à impossibilidade de aguardar dois a três anos de estocagem para determinar o prazo de validade do produto.

O estudo da estabilidade das formulações do objeto de estudo foram avaliados por valores de viscosidade aparente mínima, densidade, pH e visualização macroscópica e organoléptica obtidos ao longo do período de 90 dias, submetidas a diferentes condições de armazenamento tais como temperatura ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), estufa  $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e exposição ao UV e foi realizado também o ciclo gela degela.

Durante o período de análise as formulações praticamente não apresentaram alterações significativas, tais como picos de instabilidade.

Os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos, ( $p < 0,05$ ), em relação a testemunha, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Todos os resultados foram analisados considerando o nível de significância  $\alpha = 5\%$ .

#### **a) Análise Macroscópica**

As amostras foram submetidas a diferentes condições de armazenamento e foram avaliadas macroscopicamente. Durante a realização dos testes, não foram observadas alterações do tipo: cor, odor, aspecto após estocagem no ambiente,  $45\pm 2^\circ\text{C}$  e Exposição ao UV, durante o período de 90 dias. Exceto a formulação nº 2 apresentou-se levemente modificada (LM), com coloração amarelada após exposto ao UV, na última avaliação, indicando processos de oxidação.

Após os testes, nenhuma formulação apresentou qualquer sinal de instabilidade física, tais como a cremeação e a separação de fase. Esta última característica é uma das mais importantes a ser analisada, pois, uma vez ocorrida a separação de fases, todas as outras características específicas de uma emulsão também são afetadas.

#### **b) Ciclo gela degela**

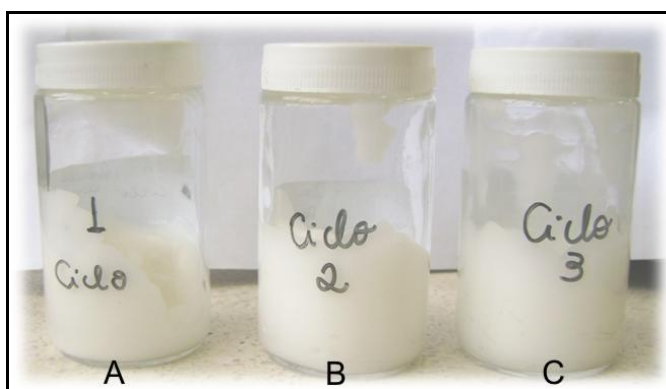
No ciclo gela degela, as amostras foram expostas a condições distintas de temperatura, ou seja, num período de tempo, o produto foi armazenado na geladeira e, no outro, na estufa, ocorrendo alternância periódica até o prazo pré-estabelecido (BRASIL, 2004). As características macroscópicas, organolépticas e físico-químicas foram avaliadas antes e após o ciclo. Após a realização do ciclo as formulações não apresentaram alterações macroscópicas e organolépticas (Figura 45), os valores pH e densidade, antes e após o ensaio, não diferem estatisticamente de acordo com a Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados ciclo gela degela

Ciclo	Formulação 1		Formulação 2		Formulação 3	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
Aspecto	N	N	N	N	N	N
Cor	N	N	N	N	N	N
Odor	N	N	N	N	N	N
pH	6,48 <sup>ns</sup>	6,61 <sup>ns</sup>	6,18 <sup>ns</sup>	6,14 <sup>ns</sup>	6,56 <sup>ns</sup>	6,69 <sup>ns</sup>
Densidade	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9660 <sup>ns</sup>	0,9713 <sup>ns</sup>	0,9816 <sup>ns</sup>	0,9916 <sup>ns</sup>	0,9804 <sup>ns</sup>

\*A média dos tratamentos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente. Onde N= normal.



Nota: A (Formulação n° 1); B (formulação n°2); C (formulação n°3)

Figura 45 – Análise macroscópica ciclo gela degela

Fonte: A autora, 2010

### c) Viscosidade

De acordo com Camargo Junior (2006) a viscosidade é considerada a medida da resistência de um material ao fluxo, sendo que quanto maior a viscosidade maior a resistência. O aumento da viscosidade sugere que o sistema emulsionante aumenta a organização das estruturas microscópicas em função do tempo (ANDRADE, 2008).

Os valores de viscosidade aparente obtidos demonstram que a formulação n°2 apresentou os maiores valores de viscosidade aparente em relação à formulação n° 1 e 3. A formulação de n° 3 apresentou o menor valor de viscosidade, contudo, não apresentou oscilações significativas no decorrer do estudo.

Com relação à viscosidade, não houve diferenças significativas, havendo estabilidade nas três emulsões testadas de acordo com Tabela 19 e Figura 46.

Tabela 19 – Resultados da viscosidade aparente mínima (cP) inicial das formulações (F1, F2 e F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e das viscosidades aparentes mínimas (cP) quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Valores calculados com spindle 6.

Viscosidade aparente mínima (cP)									
	F1			F2			F3		
Tempo	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV
Inicial	54.500 <sup>ns</sup>	54.500 <sup>ns</sup>	54.500 <sup>ns</sup>	64.000 <sup>ns</sup>	64.000 <sup>ns</sup>	64.000 <sup>ns</sup>	35.000 <sup>ns</sup>	35.000 <sup>ns</sup>	35.000 <sup>ns</sup>
7 dias	46.000 <sup>ns</sup>	46.000 <sup>ns</sup>	44.500 <sup>ns</sup>	44.000 <sup>ns</sup>	50.000 <sup>ns</sup>	44.000 <sup>ns</sup>	36.000 <sup>ns</sup>	33.500 <sup>ns</sup>	35.000 <sup>ns</sup>
15 dias	50.500 <sup>ns</sup>	49.500 <sup>ns</sup>	47.500 <sup>ns</sup>	44.000 <sup>ns</sup>	56.000 <sup>ns</sup>	56.000 <sup>ns</sup>	34.500 <sup>ns</sup>	32.500 <sup>ns</sup>	34.000 <sup>ns</sup>
30 dias	43.500 <sup>ns</sup>	46.500 <sup>ns</sup>	41.000 <sup>ns</sup>	48.000 <sup>ns</sup>	52.000 <sup>ns</sup>	40.000 <sup>ns</sup>	34.500 <sup>ns</sup>	31.500 <sup>ns</sup>	33.500 <sup>ns</sup>
60 dias	47.500 <sup>ns</sup>	50.500 <sup>ns</sup>	48.000 <sup>ns</sup>	46.000 <sup>ns</sup>	50.000 <sup>ns</sup>	42.000 <sup>ns</sup>	34.500 <sup>ns</sup>	31.500 <sup>ns</sup>	32.500 <sup>ns</sup>
90 dias	48.000 <sup>ns</sup>	46.000 <sup>ns</sup>	51.000 <sup>ns</sup>	48.000 <sup>ns</sup>	48.000 <sup>ns</sup>	44.000 <sup>ns</sup>	34.000 <sup>ns</sup>	32.000 <sup>ns</sup>	28.000 <sup>ns</sup>

\*A média dos tratamentos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup>. A média do tratamento não difere significativamente.

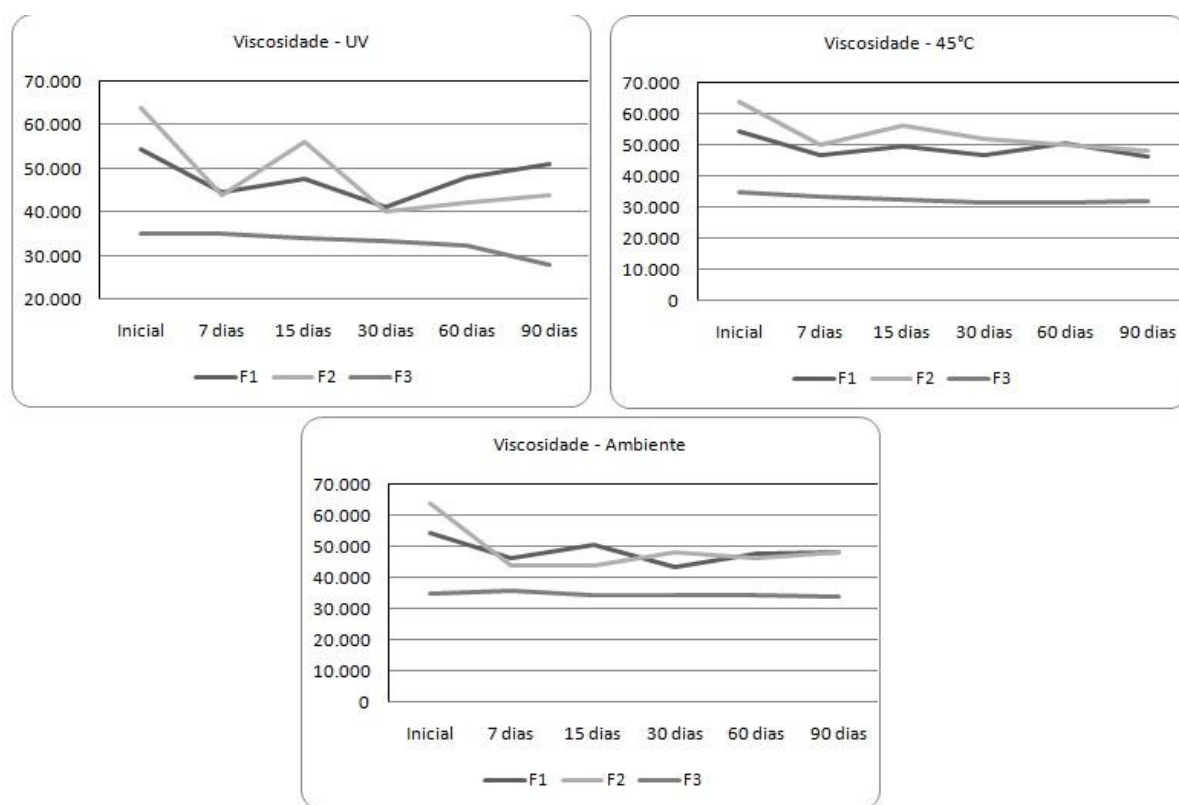


Figura 46- Gráficos da viscosidade inicial das formulações (F1, F2, F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e viscosidade quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. A média do tratamento não difere significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

#### d) pH

O valor de pH é um parâmetro significativo, também deve ser realizado para monitorar a estabilidade de emulsões, a alteração do mesmo pode indicar uma decomposição química dos componentes presentes na formulação e/ou permite ajustá-lo ao pH ótimo de ação de componentes presentes na formulação (AZZINI, 1999; FERRARI, 1998). Também pode-se ajustar a emulsão com o pH semelhante ao da pele com o objetivo de manter seu equilíbrio.

No caso de formulações com óleos vegetais a diminuição no valor de pH pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, gerando ácidos graxos livres (ANDRADE, 2008).

Todas as formulações apresentaram resultados satisfatórios em relação ao pH, dentro da faixa de variação do pH cutâneo ideal. O monitoramento da estabilidade através da determinação dos valores de pH revelou que as formulações mantiveram-se estáveis durante o período de estudo. Estatisticamente as formulações não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no valor do pH durante os 90 dias em tempos e temperaturas diferentes, sendo indicativo de processo de estabilidade (Tabela 20 e Figura 47)

Tabela 20 - Resultado do pH inicial das formulações (F1, F2 e F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e pH quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Valores calculados com spindle 6

pH									
	F1			F2			F3		
Tempo	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV
Inicial	6,48 <sup>ns</sup>	6,48 <sup>ns</sup>	6,48 <sup>ns</sup>	6,18 <sup>ns</sup>	6,18 <sup>ns</sup>	6,18 <sup>ns</sup>	6,56 <sup>ns</sup>	6,56 <sup>ns</sup>	6,56 <sup>ns</sup>
7 dias	6,58 <sup>ns</sup>	6,58 <sup>ns</sup>	6,69 <sup>ns</sup>	6,21 <sup>ns</sup>	6,03 <sup>ns</sup>	5,94 <sup>ns</sup>	6,5 <sup>ns</sup>	6,59 <sup>ns</sup>	6,62 <sup>ns</sup>
15 dias	6,48 <sup>ns</sup>	6,47 <sup>ns</sup>	6,59 <sup>ns</sup>	6,16 <sup>ns</sup>	6,05 <sup>ns</sup>	5,91 <sup>ns</sup>	6,43 <sup>ns</sup>	6,52 <sup>ns</sup>	6,53 <sup>ns</sup>
30 dias	6,59 <sup>ns</sup>	6,37 <sup>ns</sup>	6,54 <sup>ns</sup>	6,20 <sup>ns</sup>	5,94 <sup>ns</sup>	6,00 <sup>ns</sup>	6,45 <sup>ns</sup>	6,57 <sup>ns</sup>	6,58 <sup>ns</sup>
60 dias	6,45 <sup>ns</sup>	6,26 <sup>ns</sup>	6,34 <sup>ns</sup>	6,17 <sup>ns</sup>	6,01 <sup>ns</sup>	6,06 <sup>ns</sup>	6,42 <sup>ns</sup>	6,48 <sup>ns</sup>	6,54 <sup>ns</sup>
90 dias	6,60 <sup>ns</sup>	6,25 <sup>ns</sup>	6,43 <sup>ns</sup>	6,33 <sup>ns</sup>	6,01 <sup>ns</sup>	5,95 <sup>ns</sup>	6,49 <sup>ns</sup>	6,49 <sup>ns</sup>	6,59 <sup>ns</sup>

\*A média dos tratamentos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup>. A média do tratamento não difere significativamente.

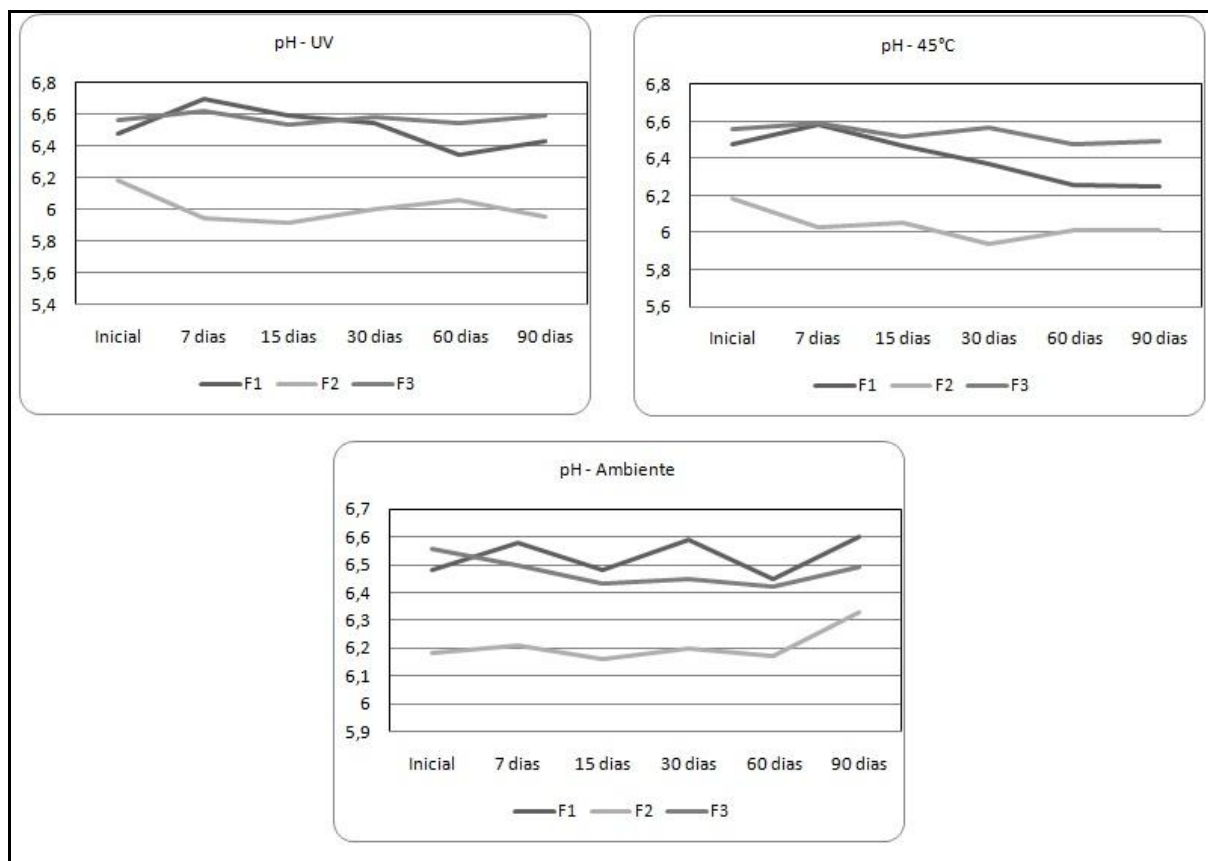


Figura 47 – Gráficos do pH inicial das formulações (F1, F2, F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e pH quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. A média do tratamento não difere significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

### e) Densidade

As formulações foram submetidas ao teste de determinação dos valores de densidade, pois esta pode estar relacionada ao controle de aeração e estabilidade do produto. Nenhuma formulação apresentou diminuição considerável da densidade não havendo aeração na formulação, uma vez seguiu as condições ideais de agitação proposta por Moraes (2006) que é de 600 rpm.

Estatisticamente as formulações não apresentam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no valor da densidade durante os 90 dias em tempos e temperaturas diferentes, sendo indicativo de processo de estabilidade (Tabela 21 e Figura 48)

Tabela 21 - Resultado da densidade inicial das formulações (F1, F2 e F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e densidade quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias

	DENSIDADE								
	F1			F2			F3		
Tempo	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV	Ambiente	45°C	UV
Inicial	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9713 <sup>ns</sup>	0,9713 <sup>ns</sup>	0,9713 <sup>ns</sup>	0,9916 <sup>ns</sup>	0,9916 <sup>ns</sup>	0,9916 <sup>ns</sup>
7 dias	0,9798 <sup>ns</sup>	0,9814 <sup>ns</sup>	0,9857 <sup>ns</sup>	0,9676 <sup>ns</sup>	0,9752 <sup>ns</sup>	0,9775 <sup>ns</sup>	0,9913 <sup>ns</sup>	0,9872 <sup>ns</sup>	0,9913 <sup>ns</sup>
15 dias	0,9773 <sup>ns</sup>	0,9890 <sup>ns</sup>	0,9909 <sup>ns</sup>	0,9677 <sup>ns</sup>	0,9777 <sup>ns</sup>	0,9809 <sup>ns</sup>	0,9769 <sup>ns</sup>	0,9937 <sup>ns</sup>	0,9936 <sup>ns</sup>
30 dias	0,9913 <sup>ns</sup>	0,9900 <sup>ns</sup>	0,9985 <sup>ns</sup>	0,9787 <sup>ns</sup>	0,9809 <sup>ns</sup>	0,9919 <sup>ns</sup>	0,9976 <sup>ns</sup>	0,9945 <sup>ns</sup>	0,9998 <sup>ns</sup>
60 dias	0,9830 <sup>ns</sup>	0,9925 <sup>ns</sup>	0,9825 <sup>ns</sup>	0,9696 <sup>ns</sup>	0,9784 <sup>ns</sup>	0,9937 <sup>ns</sup>	0,9817 <sup>ns</sup>	0,9950 <sup>ns</sup>	0,9950 <sup>ns</sup>
90 dias	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9763 <sup>ns</sup>	0,9776 <sup>ns</sup>	0,9874 <sup>ns</sup>	0,9925 <sup>ns</sup>	0,9972 <sup>ns</sup>	0,9984 <sup>ns</sup>	1,0059 <sup>ns</sup>

\*A média dos tratamentos diferem significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

<sup>ns</sup> A média do tratamento não difere significativamente.

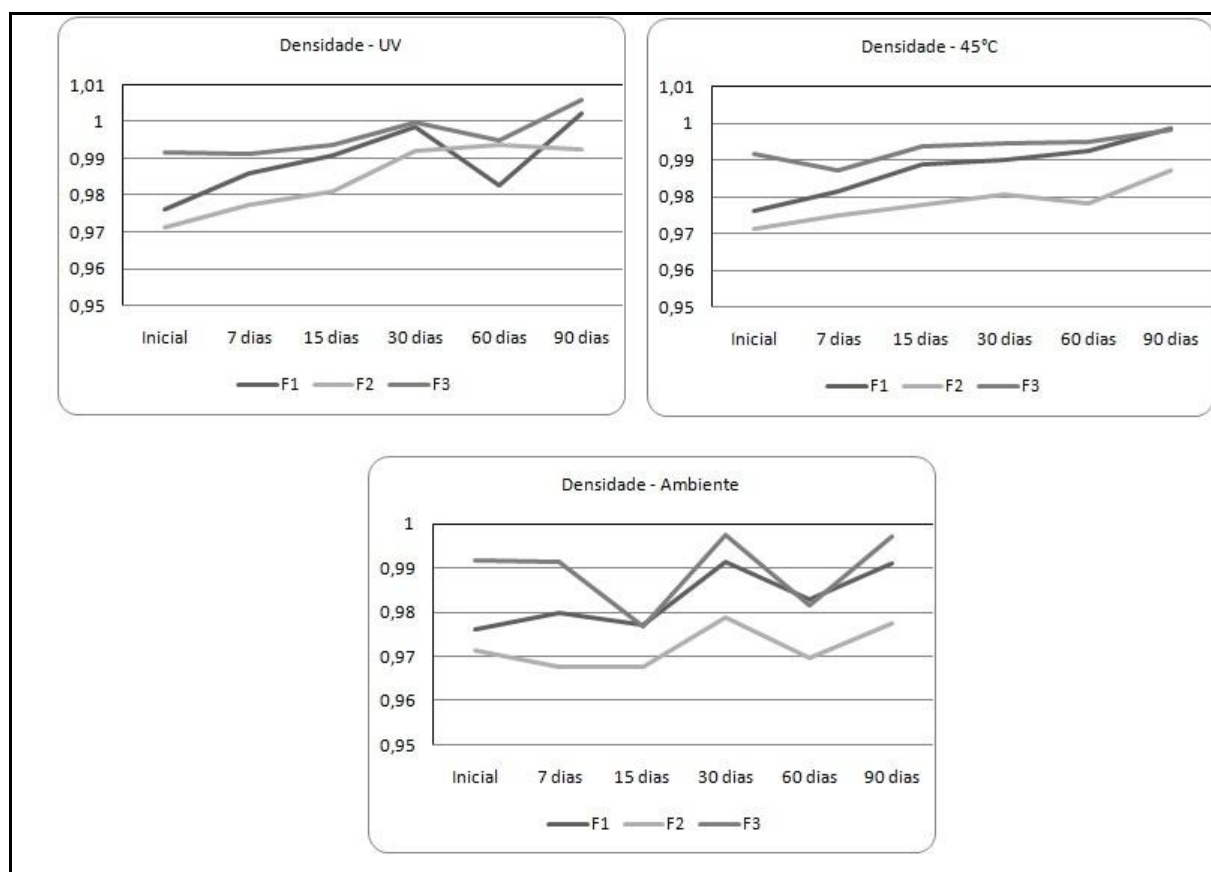


Figura 48 – Gráficos da densidade inicial das formulações (F1, F2, F3), acrescidas de 2,0% de óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, e densidade quando as formulações foram mantidas no ambiente e submetidas a 45°C e UV por 7, 15, 30, 60 e 90 dias. A média do tratamento não difere significativamente ( $p < 0,05$ ), pelo teste de Tukey.

Desse modo, as formulações nº 1, 2 e 3, foram consideradas estáveis neste estudo, sendo, assim selecionadas para a etapa de avaliação sensorial.

#### 5.14.3 Avaliação sensorial das emulsões

Existe uma grande relação na análise sensorial com o sucesso e aceitação do produto cosmético pelo consumidor, já que avaliações do pesquisador são extremamente diferentes do consumidor, que avalia o produto relacionando a sensação de bem estar imediato e não as características químicas do produto. Com este estudo pode-se direcionar melhor o produto no mercado.

Os resultados da avaliação sensorial foram realizados por pontuação individual de cada voluntária, conforme protocolo de painel aplicado e realizado. Para entendimento desta apresentação, cada requisito avaliado possui três colunas onde estão descritas as formulações, nesta coluna existe a resposta de cada voluntária para cada emulsão avaliada, para qual foram atribuídas notas de 1 a 5. O referido instrumento de avaliação encontra-se no anexo B deste trabalho.

##### 5.14.3.1 Interpretação estatística do instrumento de avaliação do teste sensorial

Testes preliminares foram realizados, com a finalidade de verificar a normalidade e a homogeneidade da distribuição amostral, a fim de decidir sobre quais tipos de testes deveriam ser empregados (paramétricos ou não paramétricos).

Estes testes revelaram que as amostras não eram homogêneas, desta maneira, para uma melhor interpretação dos resultados obtidos, o teste de escolha foi o não paramétrico de Friedman.

Foi realizado o teste para verificar se existe diferença significativa entre três formulações (F1, F2 e F3) quanto às notas atribuídas a diferentes características (Toque e pegajosidade, Espalhamento, Sensação imediata e Sensação após 5 minutos). Este teste sensorial não objetivou qualificar a funcionalidade do óleo de *Citrus*. Foram utilizadas emulsões cosméticas preparadas com associações de



matérias-primas destinadas ao sensorial agradável, com o objetivo de avaliar a capacidade de incorporar também o óleo de *Citrus*, como um dos componentes, sem interferir no aspecto sensorial, desta forma não foi necessário possuir uma formulação controle.

Para amostras pequenas (N=20) e não normalidade da variável, o Teste estatístico para comparar três amostras independentes é o teste não paramétrico de Friedman (Tabela 22).

Tabela 22 – Teste não paramétrico de Friedman para comparar as três amostras

Característica avaliada	Formulação	N	Média	Desvio Padrão	Teste de Friedman
Toque e Pegajosidade	F1	20	2,85	1,225818738	$p < 0,00335^*$
	F2	20	3,8	1,399247918	
	F3	20	4,15	0,812727701	
Espalhamento	F1	20	3,45	0,998683344	$p < 0,00097^*$
	F2	20	3,9	1,071152847	
	F3	20	4,65	0,587142949	
Sensação Imediata	F1	20	3,4	1,142481141	$p < 0,00889^*$
	F2	20	3,8	1,056309365	
	F3	20	4,25	0,910465468	
Sensação após 5 minutos	F1	20	3,2	1,23969436	$p < 0,00328^*$
	F2	20	3,6	1,142481141	
	F3	20	4,5	0,827170192	

\* significantes a 5%

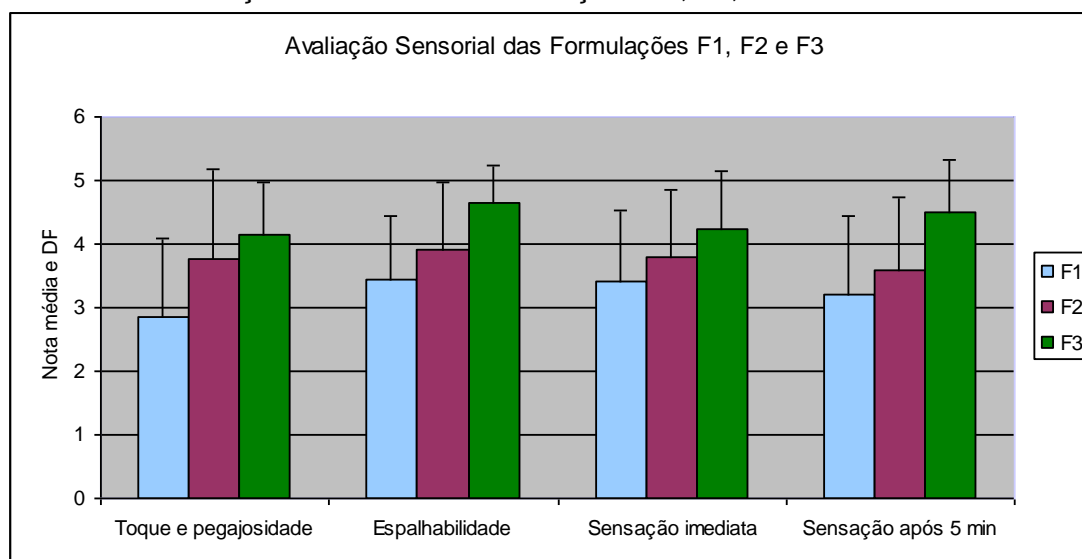
Foi observada diferença significativa entre as três formulações (F1, F2 e F3) para todas as características avaliadas pela nota atribuída. Para localizar as diferenças fez-se o Teste U de Mann–Whitney, comparando as amostras dois a dois. A Tabela 23 abaixo mostra os resultados dos testes para cada característica.

Tabela 23 – Teste U de Mann-Whitney

Grupos Comparados	Média	Média	Teste de Mann Whitney Valor Exato de p	Significância
Toque e Pegajosidade				
F1 x F2	2,85	3,8	0,030411256	p<0,05
F1 x F3	2,85	4,15	0,000747408	p<0,05
F2 x F3	3,8	4,15	0,698027551	ns
Espalhabilidade				
F1 x F2	3,45	3,9	0,20119448	ns
F1 x F3	3,45	4,65	0,000155115	p<0,05
F2 x F3	3,9	4,65	0,032643355	p<0,05
Sensação imediata				
F1 x F2	3,4	3,8	0,28876707	ns
F1 x F3	3,4	4,25	0,021076795	p<0,05
F2 x F3	3,8	4,25	0,182630837	ns
Sensação após 5 minutos				
F1 x F2	3,2	3,6	0,368862391	ns
F1 x F3	3,2	4,5	0,000933418	p<0,05
F2 x F3	3,6	4,5	0,014297273	p<0,05

Avaliando as distribuições individuais das notas atribuídas à análise sensorial para as características de Toque e de Pegajosidade, pode-se observar que as médias das formulações nº2 (F2) e formulação nº 3 (F3) são semelhantes entre si e distantes da média da formulação nº1 (F1) que recebeu menor nota avaliada pelas voluntárias. Nas distribuições individuais das notas atribuídas para a característica Espalhabilidade, pode-se observar que as médias para formulação nº1 e formulação nº2 são semelhantes entre si e distantes da média de formulação nº3 que recebeu nota média mais alta. Nas distribuições individuais das notas atribuídas para a característica Sensação imediata, pode-se observar que as médias da formulação nº 1 e nº2 apresentam semelhanças e a formulação nº 2 e nº3 não diferem entre si, mas formulação nº1 difere significativamente da formulação nº3 que recebeu nota média mais alta. Nas distribuições individuais das notas atribuídas para a característica Sensação após 5 minutos, observou-se que a média da formulação nº1 e formulação nº2 não diferem, mas formulação nº3 difere significativamente das duas outras, pois recebeu nota média mais alta.

Gráfico 5 – Avaliação sensorial das formulações F1, F2, F3



Na avaliação sensorial (Gráfico 5), verificou-se que o parâmetro toque e pegajosidade, as formulações que obtiveram notas significativamente superiores foram F2 e F3. A F1 obteve resultado menos desejável em relação às outras formulações. Em relação ao parâmetro de espalhabilidade verificou-se que a F3 apresentou uma melhor aceitabilidade pelos voluntários. Para a avaliação da sensação imediata obtida após a aplicação das formulações observou-se que as formulações F2 e F3 agradaram melhor as voluntárias em relação a F1. Já no caso do parâmetro sensação após 5 minutos da aplicação, verificou-se que a formulação F3 foi a escolhida entre as demais.

Desta forma, avaliando o conjunto de parâmetros estudados em relação à avaliação do sensorial obteve-se maior aceitabilidade pelas voluntárias a F3, um resultado esperado devido à presença da associação com silicone.

#### 5.14.4 Ensaio de irritação em modelo organotípico - HET CAM

Na avaliação da irritabilidade em modelo organotípico foi realizada apenas para formulação que apresentou maior aceitabilidade pelos voluntários, desta forma somente a formulação nº 3 foi testada. O resultado do ensaio em membrana corioalantóide apresenta-se na Tabela 24 e corresponde ao tempo que ocorreu os

diferentes efeitos provocados pela fórmula em teste. O resultado foi expresso como a média dos valores obtidos nos três ovos analisados por produto.

A formulação nº 3 apresentou ligeiro potencial irritante, porém o valor das pontuações está no limiar inferior, sendo estas quase não irritantes. O mesmo já não acontece com o controle positivo NaOH (0,1N), sendo este moderadamente irritante.

Pereira (2008) obteve resultados semelhantes aplicando este método com formulações com óleo de oliva e óleo de semente de uva, este se mostrou eficiente na identificação de produtos irritantes, porém possui baixa sensibilidade para classificar produtos moderadamente irritantes.

Para complementar esses resultados, outros métodos poderiam ser empregados para comparação dos mesmos, como as análises “*in vivo*”.

Tabela 24 – Classificação, pontuação da formulação nº 3 após o teste de irritação em modelo organotípico- HET-CAM (n=3)

Produto testado	Pontuação	Classificação
Formulação nº 3	1,6	Ligeiramente irritante

#### 5.15 MICROENCAPSULAÇÃO DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

As microcápsulas contendo o óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, com a adição de Polisorbato 80 (Figura 49 H e I) apresentaram distribuição uniforme do óleo em comparação da microcápsula isenta de Polisorbato 80 (Figura 49 D e E) . A morfologia externa das microcápsulas encontra-se na Figura 49 (A, B, C, F e G), onde predomina a forma esférica, com paredes lisas e íntegras, medianamente resistente à pressão, sem aparente porosidade e de tamanho aproximado de 500µm. Na Figura 49 (E) podemos verificar que a coloração cinza é predominante na superfície da microcápsula, enquanto que a coloração rosa predomina no núcleo da partícula contendo óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck corada com corante vermelho lipossolúvel, demonstrando que realmente o

polímero esta ao redor da borda da microcápsula e que o óleo é passível de encapsulamento para futura utilização em cosméticos.

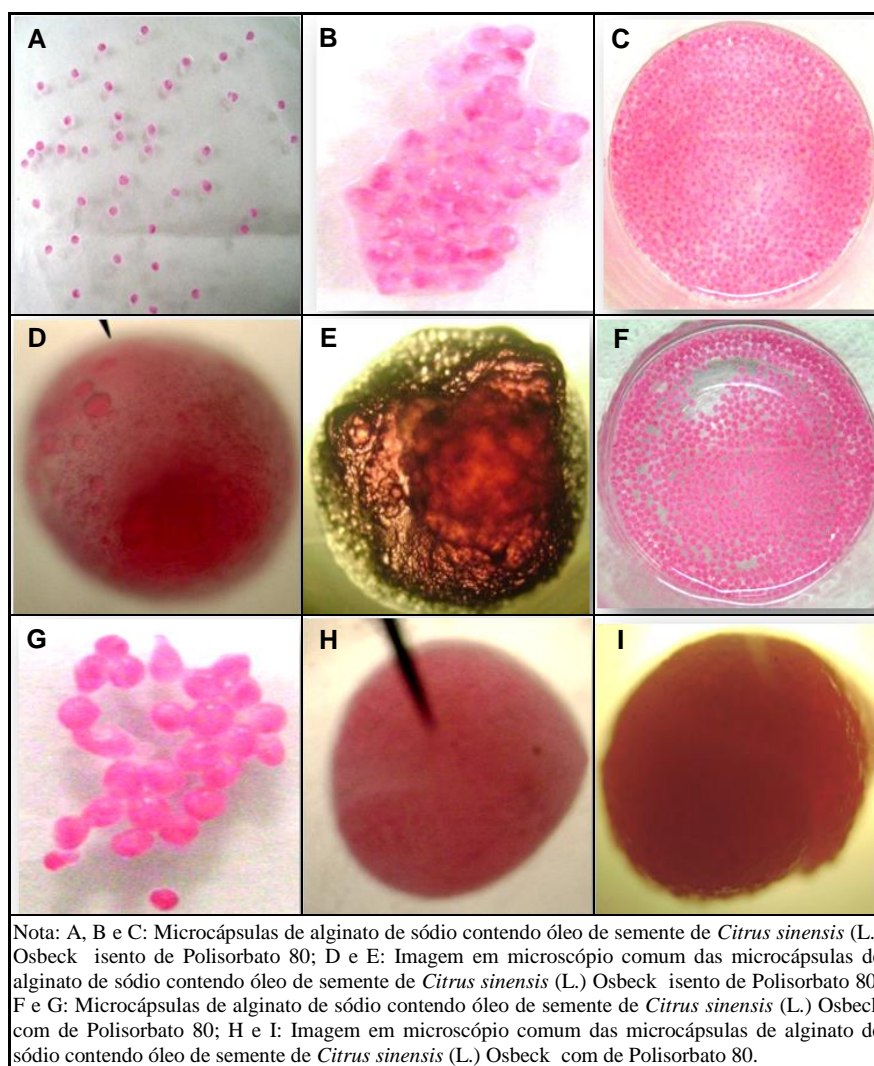


Figura 49 – Microcápsulas de alginato de sódio contendo óleo de semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

Fonte: A autora, 2011

## 6 CONCLUSÃO

A espécie *Citrus sinensis* (L.) Osbeck pertence à família Rutaceae, vários limonóides e flavonoides já foram identificados desta família. No presente trabalho foram isolados quatro compostos e dois foram identificados. A fração FC2 foi caracterizada como uma mistura de ácidos graxos e a fração FC4 apresentou mistura de dois limonóides identificados como limonina e nomilina.

O uso do óleo fixo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck como proposta na utilização industrial como matéria prima foi uma escolha adequada, devido sua composição de aproximadamente 80% de ácidos graxos insaturados (oléico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico) sendo um alto teor de poliinsaturados e rendimento próximo a 40%. O óleo também apresentou fluido não Newtoniano pseudoplástico, e boa espalhabilidade quando aplicado em emulsões, sendo apropriado em formulações dermocosméticas.

Por meio da comparação da relação ácida graxo insaturado e ácida graxo saturada presentes na FH, componente FC2 e outros óleos da flora brasileira, foi obtida uma relação igual a 5.05 da FH. Esta relação é elevada em comparação a outros óleos e inferior apenas ao óleo da semente da camomila e óleo de amêndoas, embora superior à relação de poliinsaturados /monoinsaturados, sendo desta forma atraente para o mercado industrial.

A atividade antioxidante, nos dois métodos testados (redução do complexo do fosfomolibdênio e do radical DPPH) não foi expressiva em comparação a Vit C e rutina. Pelo método do fosfomolibdênio a fração clorofórmio e metanol apresentaram maior atividade em relação às outras frações. Porém, esse resultado não se repetiu quando realizado o ensaio do DPPH, tendo a fração metanol e acetato de etila resultados superiores em relação às demais.

Na atividade antimicrobiana do extrato bruto, por meio da técnica de Concentração Inibitória Mínima, este não apresentou atividade contra as bactérias testadas.

O resultado do teste frente à *Artemia salina* sugere uma considerável bioatividade apenas da fração metanólica, pois, extratos com valores de  $DL_{50}$  inferiores a 1000  $\mu\text{g/mL}$  são considerados bioativos, caracterizando assim toxicidade desta amostra frente ao crustáceo.

O resultado negativo no ensaio de atividade hemolítica é um indicativo que esta não possui toxicidade nesse modelo, no entanto outros estudos de toxicidade *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados para que se possa avaliar a toxicidade dessa espécie.

A Fração Clorofórmio demonstrou atividade de estimulação da tirosinase com resultados estatísticos significativos na concentração de 300 µg/mL, em comparação aos controles. Este resultado nos remete a possibilidade de prosseguir os estudos para realizar ensaios com células "*in vitro*", para comprovação da utilização da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck em doenças de hipopigmentação.

Em relação aos bioensaios alelopáticos a análise dos resultados das frações de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck indicaram que a intensidade dos efeitos variou em função das frações e das concentrações utilizadas. Na velocidade de germinação, foi verificado que todas as frações a reduziram. Com relação ao crescimento, foi verificado que todas as frações causaram redução no tamanho das plântulas, nas maiores concentrações ensaiadas. No teor de massa seca, foi observado que não houve reduções significativas em nenhuma das frações em ensaio. Com relação às alterações morfológicas, foi observado que todas as frações causaram redução em alguns dos parâmetros avaliados como aumento ou redução de pelos na zona pilífera, ou oxidação na região da coifa. Na divisão celular, foi observado que com o aumento da concentração houve redução no processo de divisão. Houve alterações das atividades enzimáticas em todas as frações. No teor de proteínas, foi observado um aumento acentuado, em todas as frações. Com relação ao teor de clorofila, as frações clorofórmica e metanólica causaram redução significativa em todas as concentrações. Quanto à respiração em raízes, as amostras FCL e FM foram as que mais causaram redução no processo de respiração na concentração de 1000 mg/ L.

A escolha de emulsões preparadas a partir de base autoemulsionável foi importante para ter maior facilidade na preparação e uma maior estabilidade, pois as formulações apresentaram-se estáveis durante o teste de estabilidade preliminar e acelerada, mantendo-se estável nas diferentes condições a que foram submetidas. O resultado da espalhabilidade *in vitro* das emulsões evidencia que a emulsão nº 2 apresentou melhor resultado, a formulação nº 3 obteve resultado intermediário e a formulação que apresentou menor espalhabilidade foi a formulação nº 1. Na avaliação sensorial, a formulação nº 3 foi aquela que apresentou maior

aceitabilidade pelas voluntárias e ligeira irritação pelo método HET-CAM, sendo adequada para comercialização.

As microcápsulas contendo o óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, com a adição de polisorbato 80 apresentaram distribuição uniforme do óleo em comparação a microcápsula isenta deste. Na morfologia externa das microcápsulas predomina a forma esférica, com paredes lisas e íntegras, medianamente resistentes à pressão, sem aparente porosidade e de tamanho variado. Isto evidencia a possibilidade de encapsulamento deste óleo para futura utilização em cosméticos com intuito de reduzir possível oxidação, pois os ácidos graxos insaturados são mais suscetíveis à deterioração que outros óleos e gorduras, devido à rapidez com que o processo de oxidação ocorre quando lipídios poliinsaturados.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de subprodutos da indústria de *Citrus* é altamente desejável, visto que os depósitos contínuos desses resíduos aumentam o custo do processamento industrial, além de gerar poluição ambiental.

O presente trabalho, como benefício ambiental, propõe a utilização de resíduos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (sementes) tendo em vista o seu grande potencial como novas matérias-primas com maior valor agregado.

O trabalho demonstrou a necessidade de pesquisas multidisciplinares desde o ponto de vista fitoquímico, até estudos que abordem atividades biológicas e dermatocósméticas, de tal forma que a mesma incentive diversos ramos da ciência, permitindo melhores resultados. Nesta pesquisa foram envolvidos processos extrativos, isolamento e caracterização do óleo fixo extraído da semente, bem como algumas atividades biológicas e a aplicação do material obtido, que permitiram definir o perfil desta pesquisa como “Fitoquímica Aplicada”.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 469p.
- ABEYSINGHE, D. C. *et al.* Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of *Citrus* fruit of four species. **Food Chemistry**, v.104, n. 4, p.1338-1344, 2007.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Meth Enzymol**, v.105, p.121-126, 1984.
- AJEWOLE, K.; ADEYEYE, A. Characterization of Nigerian *Citrus* seed oils. **Food Chemistry**, v.47, n. 1, p.77-78, 1993.
- AKPATA, M. I.; AKUBOR, P. I. Chemical composition and selected functional properties of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck ) seed flour. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.54, n. 4, p.353-362, 1999.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F. Reologia: interesse aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries** (ed. Port.), v.15, n.3, p.96-100, 2003.
- ALSAADAWI, I. S.; ARIF, M. B.; ALRUBEAA, A.J. Allelopathic effects of *Citrus aurantium* L.II. Isolation, characterization, and biological activities of phytotoxin. **Journal of Chemical Ecology**, v.11, n.11, p.1527-1534, 1985.
- ALVAREZ, M. J. M. *et al.* Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de flavonoides de cáscara de naranja en el aceite de soja desodorizado. **INCI**, v.29, n.9, p.532-538, 2004.
- AMAKO, K.; CHEN, G. X.; ASADA, K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants. **Plant Cell Physiol**, v.35, n.3, p.497-504, 1994.
- AMAROWICZ, R. *et al.* Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, v 84, n. 4, p.562, 2004.
- ANDRADE, F. F. de. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico**. 2008. 151F. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto, - Universidade de São Paulo.
- ANWAR, F. *et al.* Physico-Chemical Characteristics of *Citrus* Seeds and Seed Oils from Pakistan. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.85, n.9, p.321–330, 2008.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, **Official methods of analysis**. 10. ed. Washington: Editorial Board, 1965. 909p.

ARDLE, M. C.; LETOURNEAU, R. N.; STEPHEN, A. Method of making a flaveddo powder for enhancement of orange juice and product thereof. **United States Patent**, v.54, n. 3, p.1870, 2000.

ARNON, D. I. Copper and enzymes in isolated chloroplast. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v.24, n. 2, p.1-15, 1949.

ASCHERI, D. P. R. **Estudo das características de adsorção de água e da estabilidade das microcápsulas de óleo essencial laranja na seleção de material de parede.** 1999. Disponível em: <<http://www.scielo.com.br/cienciaetecnologiadealimentos.htm>>. Acesso em: 21 jul. 2009.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 10.ed. Washington: Editorial Board, 1965.

AYRES, M. C. C. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, Jan./Mar. 2008.

AZZINI, R. G. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos.** 1999. 169f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

BARATA, E. **A cosmetologia**: informação base. 2.ed. Lisboa: Fim de Século, 1994.

BARNES, J. P. *et al.* PUTNAM, A.R.; ZBURKE, B.A.; AASSEN, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1385-1390, 1987.

BAUMANN, L. **Dermatologia cosmética**: princípios e prática. Rio de Janeiro: Revinter, 2002.

BAZIRAMAKENGA, R.; SIMARD, R. R.; LEROUX, G. D. Effects of benzoic and cinnamic acids on growth, mineral composition and chlorophyll content of soybean. **Journal of Chemical Ecology**, v.20, n. 11, p.2821-2833, 1994.

BENAVENTE-GARCIA, O. *et al.* Uses and properties of *Citrus* flavonoids. **J Agric Food Chem**, v.45, n.12, p.4505-4515, 1997.

BIANCO, E. M. **Química e potencial antioxidante de folhas e caules de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr., Caesalpiaceae.** 2003. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BLUM, U.; REBBECK, J. Inhibition and recover of cucumber roots given multiple treatments of ferulic acid in nutrient culture. **Journal of Chemical Ecology**, v.15, n 3. p.917-928, 1989.

BOCCO, A. *et al.* Antioxidant activity and phenolic composition of *Citrus* peel and seed extracts. **J Agric Food Chem**, v.46, n.6, p.2123-2129, 1998.

BORTOLUZZI, R. C.; MARANGONI, C. Caracterização da fibra dietética obtida da extração do suco de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.8, n.1, p.61-66, 2006.

BRACONI, F. L. *et al.* Aplicação cosmética do óleo de canola. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12., 1995, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995. p.6-19.

BRADFORD, M. M. A rapid e sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, n. , p.248-254, 1976.

BRANCO, I. G. *et al.* Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um *blend* de laranja e cenoura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.7-12, jan.-mar., 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de cosméticos. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, Brasília: SNDA/DNDU/CLU, 1992.

BUCKERIDGE, M. S. *et al.* Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 11. p. 163-185.

CAMARGO JÚNIOR, F. B. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo pantenol e avaliação dos seus efeitos hidratantes na pele humana por bioengenharia cutânea**. 2006. 152 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

CANSIAN, F. C. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie *Tynanthus micranthus* corr. Mélo (Bignoniaceae)**. 2010. 102f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO, R. de. **Variabilidade cromossômica e relação entre espécies e cultivares de *Citrus* L.** 2003. 133f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco.

CAYON, D.G.; LOPES, N.L.; OLIVA, M.A., SILVA, J.F. Teores de clorofila e proteína bruta em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) tratada com imazaquin. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n.3, p. 33-40, 1990.

CHEN, Y. *et al.* Comparasion of albumin and casein microspheres as a carrier for doxorubicin. **J Pharm Pharmacol**, London, v.39, n.12, p.978–985, 1987.

CHIEN, Y. W. **Novel drug delivery systems**. New York: Ed. Marcel Dekker, 1992.

CHOU, C. H. Roles of allelopathy in plant biodiversity and sustainable agriculture. **Critical Reviews in Plant Science**, v.18, n.5, p. 609-636.

CIRIO, G. M. *et al.* Interrelação de parâmetros agronômicos e físicos de controle de qualidade de *Maytenus ilicifolia*, Mart ex. Reiss (Espinheira-santa) como insumo para indústria farmacêutica. **Visão Acadêmica**, v.4, n. 2, p.67-76, 2003.

CLSI (National Committee for Clinical Laboratory Standards). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard – Eight edition M7-A8, 2009.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 3.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2000.

COSTA. C. K. **Estudo fitoquímico de *bixa orellana* L., bixaceae e aplicação de seu óleo em formulação cosmética**. 2007. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

CUZZI-MAYA, T.; PIÑEIRO-MACIEIRA, J. **Dermatopatologia: bases para o diagnóstico morfológico**. São Paulo: Roca, 2001.

DELACHIAVE, M.H.A.P.; ONO, E.O.; RODRIGUES, J.D. Efeitos alelopáticos de grama-seda (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) na germinação de sementes de pepino, milho, feijão e tomate. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 21, p.194-197, 1999.

D'LEÓN, L. F. P. Estudo de Estabilidade de Produtos Cosméticos. **Cosm. Toil** (Edição em Português), v 13, n. 4, p.54-60, Jul./Ago., 2001.

DAHMS, G. H. Rheology-ita effect on physical SPF's. **Soap Perfum Cosmetics**, v. 2, n. 12, p.23-25, 1996.

DAL' BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. **Skin Research and Technology**, v.12, n. 4, p.241-246, 2006.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n.9, p.2079-2093, 2000.

DAYAN, F. E.; ROMAGNI, J. G.; DUKE, S. O. Investigating the mode of action of natural phytotoxins. **Journal of Chemical Ecology**, v.26, n. 9 .p.2079-2094, 2000.

DIAS, J. F. G. *et al.* Contribuição ao estudo alelopático de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.220-223, 2005.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v.64, p.351-359, 1999.

DUDA-CHODAK, A.; TARKO, T. Antioxidant properties of different fruit seeds and peels. **Acta Sci Pol Technol Aliment**, v.6, n. 3, p.29-36, 2007.

DUKE, S. O. Effects of herbicide on nonphotosynthetic biosynthetic process. In: DUKE, S.O. (ed.) **Weed Physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v.2, p. 91-112.

ECCLESTON, G. M. Formulating cosmetic emulsions. **Cosmetics & toiletries**, Oak Park, v.112, n. 12, p.65-71, 1997.

EFING, L. M. A. C. **Compostos bioativos do material resinoso, subproduto do processamento da erva-mate (Ilex paraguariensis A. St. –Hil.)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná.

EINHELLIG, F. A.; KUAN, L. Effects of scopolin on growth, CO<sub>2</sub> exchange rates, and concentration of scopolin, scopolin and chlorogenic acids in tobacco, sunflower and pigweed. **Bulletin Torrey Botanical Club**, v.98, p.155-162, 1971.

EINHELLIG, F. A.; RASMUSSEN, J. A. Effects of tree phenolics acids on chlorophyll content and growth of soybean and grain sorghum. **Journal of Chemical Ecology**, v.5, n. 2, p.815-824, 1979.

EINHELLIG, F. A. Mechanisms and modes of action of allelochemicals. In: PUTNAM, A. R; TANG, C. H.-S. (eds.). **The Science of Allelopathy**. Nova York, John Wiley and Sons, 1986. p.171-188.

EL-ADAWY, T. A. *et al.* Properties of some *Citrus* seeds. Part 3. Evaluation as a new source of potential oil. **Nahrung**, v. 43, n. 2, p.385–391, 1999.

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: EDUSP, 1974. 293p

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre / Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

FANG, X. *et al.* NMR studies of molecular structure in fruit cuticle polyester. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p.1035-1042, 2001.

FARAG, R. S. *et al.* Antioxidant activity of some spices essential oils on linoleic acid oxidation in aqueous media. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.66, n. 6 , p.792–799, 1986.

FARIA, Elaine Alves de *et al.* Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclet. Quím.** [online]. 2002, vol.27, pp. 00-00

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FERNANDES, J. B. *et al.* Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1091-1095, 2002.

FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões **múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*)**. 2002. 142f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba**. 1998. 147f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERRUA, F. Q. **Estudo do processo de desterpenação do óleo essencial de laranja por adsorção: seleção de adsorventes e modelagem do processo**. 2001. 427f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FILSOOF, M.; MEHRAN, M. Fatty Acid Composition of Iranian *Citrus* Seed Oils. **Journal of the American of Iranian**, v.53, n.10, p.654-655, 1976.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1956.

GARCÍA, C. C. **Efectos de terpenoides naturales y hemisintéticos sobre “*leptinotarsa decemlineata* (say)(coleoptera:chrysomelidae) y “*spodoptera exigua* (hübner)(lepidoptera: nocturnae)**. 2004. 119f. Tese (Doutorado) - Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas.

GARDNER, P. T. *et al.* The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruits juices. **Food Chemistry**, v.68, n.4, p.471-474, 2000.

GIANNUZZO, A. N. *et al.* Extracción de naringina de *Citrus paradisi* L. estudio comparativo y optimización de técnicas extractivas. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.20, n.2, p. 257-261, 2000.

GIOIA, F.; CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Research and Technology**, Copenhagen, v.8, n. 3, p.178-186, 2002.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Rev. bras. farmacogn** [online], v.5, n.2, p. 211-232, 1996.

GONSALVES, J. K. M. C. *et al.* Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck (L.) Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, v.5, n.11, p. 102-111, 2009.

GORINSTEIN, S. *et al.* Comparison of some biochemical characteristics of different *Citrus* fruits. **Food Chemistry**, v.74, n. 13, p.309-315, 2001.

GRAY, T. M. *et al.* Destabilizing effect of proline substitutions in two helical regions of T4 lysozyme: Leucine 66 to proline and leucine 91 to proline. **Protein Science**, v.5, n. 4, p.742-751, 1996.

GUPTA, A. S. *et al.* Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. **Plant Physiol**, v.103, n. 4, p.1067-1073, 1993.

HABIB, M. A. *et al.* Chemical evaluation of Egyptian *Citrus* seeds as potential sources of vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.63, n. 9, p.1192-1197, 1986.

HANASAK, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biol. Med.** v.16, n 2 , p.845-850, 1994.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M. M. **Manual de cosmetologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HIRATA, L. L. **Avaliação da capacidade antioxidante de extratos de *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbride, Cesalpiniaceae, em serum**. 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

KEDE, M. P. V; SABATOVICH, O. **Dermatologia Estética**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry, *Lebensmittel. Wissenschaftat Technologie*, v.24, n. 2, p.289-297, 1991.

JANK, M.; NEVES, M. **Perspectivas da cadeia produtiva da laranja no Brasil: a agenda** 2015. 2006. Disponível em: <[http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda\\_Citrus\\_2015\\_PENSAICO\\_NE.pdf](http://www.fundacaofia.com.br/pensa/downloads/Agenda_Citrus_2015_PENSAICO_NE.pdf)>. Acesso em: maio 2010.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, v.73, n. 3, p.285-290, 2001.

JAYAPRAKASHA, G. K.; TAMIL SELVI, A.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v.36, n. 5, p.117-122, 2003.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**. New York, Freeman, W. H., 1962.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 7.ed. São Paulo: Editora Nacional, 1985.



KATO-NOGUCHI, H.; TANAKA, Y. Allelopathic potencial os *Citrus* junos fruit wast from food precessing industry. **Bioresource Tecnologia**, v.94, n.2, p.211-214, Sept. 2004.

KHAN, S. R. A. *Citrus* quality to meet global demand. **Pakistan agriculture overview**. Disponível em: <<http://www.pakissan.com/english/agri.overview/index.shtml>. 25 Nov 2005>. Acesso em: 16 jul. 2009.

ITOH, K. *et al.* Inhibitory Effects of *Citrus hassaku* Extract and Its Flavanone Glycosides on Melanogenesis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n.3410, p. 405-410, 2009.

KHALIL, A. T.; MAATOOQ, G. T.; EL SAYED, K. A. Limonoids from *Citrus reticulata*. Zeitschrift fuer Naturforschung, C. **Journal of Biosciences**, v.58, p.165-170, 2003.

KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos de algumas sementes de frutas para aproveitamento de resíduos industriais. **Ciências e agrotecnologia**, Lavras, v.29, n.5, p.1008-1014, 2005.

LABOURIAU, L. G. **A germinação de sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos, 1983.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000.

LEONARDI, G. R.; CHORILLI, M. **Dermofarmácia**: bases dermocosméticas, microemulsões & lipossomas. São Paulo: RX Editora, 2008.

LIM, Y. *et al.* Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone – induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tussues. **Archives of Pharmacal Research**, v.32, n.3, p.367-373, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. 2002. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

LUEPKE, N. P. Hen's egg choriallantoic membrane test for irritation potential. **Food Chemical and Toxicology**, v.23, n. 5, p.287-291, 1985.

LUZIA, D. M. M. L.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Quimica Nova**, v.32, n.4, p.1-4, 2009.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACRINI, D. J. **Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase**. 2004. 64 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

MAGALHÃES JUNIOR, D. M.; NEGRI, J. D. P.; PALHARES JUNIOR, J. **Citros**. Campinas: Instituto Agronômico; Fundag, 2005.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 1, n. 2, p.176-177, 1962.

MAHMOOD, M. A. Hurdles in way of *Citrus* export. **Dawn**. Disponível em: <<http://www.dawn.com>>. Acesso em: 16 jul. 2009.

MANNER, H. I. *et al.* *Citrus* species (*citrus*), ver. 2.1. In: Elevitch, C.R. (ed.). **Species Profiles for Pacific Island Agroforestry: Permanent Agriculture Resources (PAR)**, 2006. Disponível em: <<http://www.traditionaltree.org>>. Acesso em: 16 jul. 2009.

MAPA Jardim Alegre. Disponível em: <[pt.wikipedia.org/wiki/Jardim\\_Alegre](http://pt.wikipedia.org/wiki/Jardim_Alegre)>. Acesso em: 16 ago. 2009.

MARQUES, M. R., XAVIER-FILHO, J, Enzymatic and inhibitory activities of cashew tree gum exudate. **Phytochem**, v.30, n.5, p.1431-1433, 1991.

MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. Rheology. In: MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. **Physical Pharmacy**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. cap.17. p.453-473.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Arch Latinoam Nutr**, Caracas, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MASSARO, R. C. *et al.* O/W dispersions development containing liquid crystals. **Bollettino Chimico Farmacêutico**, v.142, n.7, p.264-270, 2003.

MASSON, D. S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes**. 2005. 163f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MATSUURA, R.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Tyrosinase Inhibitory Activity of *Citrus* Essential Oils. **J Agric Food Chem**, v.54, n.6, p.2309–2313, 2006.

MAULI, M. M. *et al.* Alelopatia de *Leucena* sobre soja e plantas invasoras. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.30, n.1, p.55-62, 2009.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bendh-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. R. (Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam. **Elsevier Science Publis hers B.V.**, v.9 , n.1, p. 383-409, 1991.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v.45, n. 5, p.31, 1982.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity bythe use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130,2001.

MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 33, n. 4, p.1261-1270, 1998.

MIYAZAWA, M. *et al.* Tyrosinase inhibitor from black rice bran. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, n. 24, p.6953-6956, 2003.

MORAIS, G. G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. 2006. 181f. Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

MOULY, P. P.; GAYDOU, E. M.; ARZOUYAN, C. Separation and quantification of orange juices using liquid chromatography polymethoxylated flavones. **Analisis**, v.27, n. 3, p.284-288, 1999.

MURILLO, G. *et al.* Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicología**, v.20, n. 3, p.187-192, 2003.

MURPHY, B. T. **Isolation and structure elucidation of antiproliferative natural products from Madagascar**. 2008. 182f. Dissertação (Mestrado) Faculty of Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemistry.

NADIAN, A., LINDBLOM, L. Studies on the development of a microencapsulated delivery system for norbormide, a species-specific acute rodenticide. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 242, p. 63-68, 2002.

NASCIMENTO, J. E. *et al.* Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larva de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Rev Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.29, n.2, p.145-150, 2008.

NASCIMENTO, R. J. S. *et al.* Composição em ácidos graxos do óleo da polpa de açaí extraído com enzimas e com hexano. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.30, n.2, p. 498-502, 2008.

OBAGI, Zein. **Restauração e rejuvenescimento da pele**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.

OHGUCHI, K.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Stimulation of Melanogenesis by the *Citrus* Flavonoid Naringenin in Mouse B16 Melanoma Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.70, n.6, p.1499-1500, 2006.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de Jorro**. 2006. 77f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, L. C.; BLOISE, M. I. Extratos e óleos naturais vegetais funcionais. **Cosmetics & Toiletries**, v.7, n.2, p.30-37, 1995.

OLIVEIRA, V. R. *et al.* Efeito do herbicida trifluralin sobre a germinação de sementes e índice mitótico em raízes de milho (*Zea mays* L.). **Revista Unimar**, v.18, n. 1, p. 537-544, 1996.

OOGHE, W. C.; DETAVERNIER, C. M. Detection of the addition of *Citrus reticulata* and hybrids to *Citrus sinensis* (L.) Osbeck by flavonoids. **J Agric Food Chem**, v.45, n. 5, p.1633-1637, 1997.

OZAKI, Y. *et al.* Limonoid glucosides in *Citrus* seeds. **Agric Biol Chem**, v.55, n. 17, p.137-141, 1991.

PAIVA, S. R. de; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.76, n.3, p.499-504, 2004.

PASQUALIM, P. *et al.* Microcápsulas de alginato de cálcio e óleo vegetal pela técnica de gelificação iônica: um estudo da capacidade de encapsulamento e aplicação dermatológica. **Visão Acadêmica**, v.11, n.1, p. 23-37, 2011.

PEIXOTO NETO, P. A. de S.; CAETANO, L. C. **Plantas medicinais do popular ao científico**. Alagoas: Edufal, 2005.

PERECIN, M. B.; BOVI, O. A.; MAIA, N. B. Pesquisa com plantas aromáticas, medicinais e corantes: o papel do Instituto Agronômico. **O Agrônomo**, Campinas, v.54, n.2, p.21-24, 2002.

PEREIRA, G. G. **Obtenção de nanoemulsões O/A a base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octil a e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões**. 2008. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo.

PEREIRA, N. P. **Estudo fitoquímico do óleo da semente de [ *Camomilla recutita* (L.) Rauschert] Camomila, com avaliação de propriedades físico- químicas, biológicas e funcionais em emulsões**. 2008. 192f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

PEREIRA, N. P. ; CUNICO, M. M., MIGUEL, O. G.; MIGUEL M. D. Promising New Oil Derived from Seeds of *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert Produced in Southern Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n.5, 493-494, 2008.

PERIOTTO, F; PEREZ, S. C. J. G. DE A., LIMA, M. I. S. Efeito alelopático de *Andira humilis* Mart. Ex Benth na germinação e no crescimento de *Lactuca sativa* L. e *Raphanus sativus* L. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.3, p.425-431, 2004.

PERSSONELLE, J. G. **Cosmiatria: a ciência da beleza**. Rio de Janeiro: Revinter,

2004.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, n.2, p.337-341, 1999.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v.1

PUTTER, J., Peroxidase. In: BERGMEYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie: Weinhan, 1974. p.685-690.

REDA, S. Y. *et al.* Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciênc Tecnol Aliment**, v.25, n.4, p.672-676, 2005.

RIBEIRO, A. R. **Fitoquímica do caule de *Citrus limonia* enxertado com *C. sinensis* e da espécie *Nycticalanthus speciosus* (Rutaceae) e biossíntese de cumarinas preniladas**. 2006. 300f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos

RICE, E.L. **Allelopathy**. Orlando: Academic Press, 1984.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, (ed. Port.), v. 8, n. 5, p. 47-53, set./out. 1996.

ROLAND, I. *et al.* Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, n. 1-2, p.85-94, 2003.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROMRELL, L. J. **Histologia**: Atlas e textos - Pele e anexos. 2.ed. São Paulo: Panamericana, 1993. p.347- 364.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. **Biol Pharm Bull**, v. 29 n.2, p.191–201, 2006.

RUBERTO, G. *et al.* *Citrus* limonoids and their semisynthetic derivatives as antifeedant agents against *Spodoptera frugiperda* Larvae. A structure –a Activity Relationship Study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6766-6774, 2002.

SAIDANI, M.; DHIFI, W.; MARZOUK, B. Lipid evaluation of some Tunisian *Citrus* seeds. **Journal of Food Lipids**, v.11, n. 3, p.242–250, 2004.

SALEEM, M. *et al.* Fatty acids of indigenous resources for possible industrial applications. **Pakistan J Sci Ind Res**, v.20, n. 5, p.305–306, 1977.

SAMPAIO, S. de A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**: Anatomia e fisiologia. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 3 - 21.

SASAKI, K.; YOSHIZAKI, F. Nobiletin as a Tyrosinase Inhibitor from the Peel of

*Citrus* Fruit. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.6, p.806, 2002.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Byproducts of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. **Trends Food Science Technology**, Cambridge, v. 12, n. 3, p. 401-413, 2001.

SCHULZ, H. *et al.* 2002. Quantitative analysis of various *Citrus* oils by ATR/FT-IR and NIR-FT Raman spectroscopy. **Spectroscopic techniques**. v.56, n.1, p.117–124, 2002.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, n.6, p.501-547, 1993.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N.; AMAROWICJ, R. Natural antioxidant from low pungency mustard flour. **Food Research International**, v.27, n.6, p.489–493, 1994.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre:Editora UFRGS, 2007.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Chidamabara antioxidant activity of pomegranate (*Punica garanatum*) peel and seed extracts using *in vitro* models. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 101, n.1, p. 81–86, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, F. X.; MORRIL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5 ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1994.

SOUSA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. Anatomia, Fisiologia e Histologia da pele. In: KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 3-8.

SOUZA FILHO, A. P. S. Atividade potencialmente alelopática de extratos brutos e hidroalcoólicos de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). **Planta daninha**, v.20, n.3, p.357-364, 2002.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v.42, n.1, p.1423-1426, 1967.

STEUER, B.; SCHULZ, H.; LAGER, E. Classification and analysis of *Citrus* oils by NIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 72, n.1, p.113–117, 2001.

SWINGLE, W. T. The botany of *Citrus* and its wild relatives. In: REUTHER, W.; WEBER, H. J.; BATCHELOR, L. D. (eds). **The Citrus Industry. History, world distribution, botany and varieties**. Berkeley: University of California Press, 1967. v.1. p.190-430.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. TANAKA, T. Fundamental discussion of *Citrus* classification. **Study in Citrologia**, Osaka, v.14, n. 1, p.1-6, 1977.

TAO, N. G. *et al.* Essential oil composition and antimicrobial activity of *Citrus reticulata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v.45, n.3, p. 437-438, 2009.

TRANDJISKA, R.; NGUYEN, H. Triglyceride composition of seed oils from Vietnamese *Citrus* fruits. **Riv Ital Sost Grasse**, v. 31, n. 6, p. 99–100, 1989.

UTYAMA, I. K. A. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica *in vitro* do vinagre e ácido acético: perspectiva na terapêutica de feridas.** 2003. 148f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

VIGLIOGLIA, P. A.; RUBIN, J. **Cosmiatria II.** Buenos Aires: Ap Americana de Publicaciones S.A., 1989.

VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Controle químico de qualidade defitoterápicos e plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e amoderna farmacognosia.** Itajaí: Univali; 2007. p.157-182.

VINARDELL, M. P.; GARCIA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicology In Vitro**, v.14, n. 14, p.551- 556, 2000.

VINARDELL, M.P.; MITJANS, M. The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation by commonly used laboratory solvents. **Toxicology In Vitro**, v.20, p. 1066- 1070, 2006.

VIRADOR, V. M. *et al.* A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v. 270, n. 2, p.207–219, 1999.

WAHEED, A. *et al.* Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of *Citrus* seed oil. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.13, n. 3, p.269-272, 2009.

ZANIN, S. M. W. *et al.* Parâmetros físicos do estudo das estabilidade das emulsões. **Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47-58, jul./dez. 2001.

## ANEXOS

## ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
Setor de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa



Curitiba, 04 de agosto de 2010.

Ilmo (a) Sr. (a)  
**Patrícia Mayra Pavan Nunes**  
Nesta

Prezado (a) Pesquisador (a),

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “**Semente de Citrus Sinensis (L) Osbeck: estudo fitoquímico e sua potencial aplicação na área cosmética**”, está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução CNS 196/96, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, em reunião realizada no dia 23 de junho de 2010 e apresentou pendência(s). Pendência(s) apresentada(s), documento(s) analisado(s) e projeto aprovado em 04 de agosto de 2010.

Registro CEP/SD: 939.064.10.06

CAAE: 0039.0.091.000-10

Conforme a Resolução CNS 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do relatório final ou parcial: 04/02/2011.

Atenciosamente

**Profa. Dra. Liliana Maria Labronici**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Setor de Ciências da Saúde/UFPR

Profª. Dra. Liliana Maria Labronici  
Coordenadora do Comitê de Ética  
em Pesquisa - SD/UFPR

Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240  
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica.saude@ufpr.br



## ANEXO B – QUESTIONÁRIO AVALIAÇÃO SENSORIAL

Questionário entregue as voluntárias para a realização do teste sensorial.

### Avaliação sensorial

Nome: \_\_\_\_\_

Qual nota, de 1 a 5 (desgostei muito até gostei muito), você daria sobre as seguintes características de cada formulação?

Toque e pegajosidade			Espalhabilidade			Sensação imediata na pele			Sensação na pele após 5 minutos		
F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_